

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Monozyten als Zielzellen zur Therapie von *Colitis ulcerosa*

Von Alena Katharina Rücher  
aus Butjadingen  
München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am Klinikum der LMU München:

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie

Mentorin: Dr. Roswitha Gropp

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

Meiner Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>13</b>
2.1	Colitis ulcerosa.....	13
2.1.1	Definition.....	13
2.1.2	Vorkommen .....	13
2.1.3	Ätiologie .....	13
2.1.4	Pathogenese .....	15
2.2	Klinisches Erscheinungsbild .....	19
2.2.1	Diagnostik.....	19
2.2.2	Klassifizierung.....	21
2.2.3	Verlauf der Colitis ulcerosa .....	22
2.2.4	Therapie .....	22
2.2.5	Spätfolgen .....	24
2.3	Immunologie .....	25
2.3.1	Angeborene Immunität .....	25
2.3.2	Die Rolle der Monozyten und Makrophagen .....	25
2.3.3	Erworbene Immunität .....	28
2.4	Tiermodelle der Colitis ulcerosa .....	33
2.4.1	Mäuse mit humanem Immunsystem .....	33
<b>3</b>	<b>Zielführung der Arbeit .....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>37</b>
4.1.1	Auswahl der Spender .....	37
4.1.2	Tierhaltung.....	37
4.1.3	Isolierung humaner PBMC .....	37
4.1.4	Rekonstitution.....	38
4.2	Versuchsablauf.....	39
4.2.1	Versuchsgruppen .....	39
4.2.2	Medikamente .....	40
4.2.3	Klinischer Aktivitätsscore .....	41

4.2.4	Makroskopischer Kolon Score .....	43
4.3	Analysen.....	45
4.3.1	Versuchsende .....	45
4.3.2	Durchflusszytometrie.....	45
4.3.3	Histologie.....	47
4.3.4	Immunhistochemische Färbung (IHC) .....	51
4.3.5	Detektion von Zytokinen im Kolon .....	53
4.3.6	Statistik .....	54
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
5.1	Immunprofil und klinischer Score der Spender .....	55
5.2	Effekte des Monozyteninhibitors im Mausmodell .....	57
5.2.1	Beurteilung der klinischen Wirksamkeit .....	57
5.2.2	Wirkmechanismus auf die Immunzellen in der Milz .....	62
5.2.3	Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) zur Beurteilung der Wirkung im Mausmodell.....	69
5.2.4	Pearson Korrelation zur Bewertung des Zusammenhanges zwischen Leukozyten in der Milz und dem klinischen Bild der Kolitis im Mausmodell .....	72
5.2.5	Wirkung auf die Sekretion von Zytokinen .....	73
5.3	Visualisierung humaner Monozyten mittels Immunhistochemie .....	<b>75</b>
5.3.1	Analyse von humanen Kolonbiopsien .....	75
5.3.2	Effekte des Monozyteninhibitors.....	77
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
<b>6.1</b>	<b>Ziel I: Immunprofilierung der Spender .....</b>	<b>83</b>
6.1.1	Hypothese 1: Die klinische Aktivität der Kolitis im Mausmodell ist abhängig vom Spender .....	83
<b>6.2</b>	<b>Ziel II: Monozyteninhibition als Therapieansatz.....</b>	<b>83</b>
6.2.1	Hypothese 2.1: Der Monozyteninhibitor erniedrigt den klinischen Aktivitätsscore .....	83
6.2.2	Hypothese 2.2: Der Monozyteninhibitor erniedrigt den makroskopischen Kolon Score .....	84
6.2.3	Hypothese 2.3: Der Monozyteninhibitor erniedrigt den histologischen Score .....	84

<b>6.3 Ziel III: Die Wirkung des Monozyteninhibitors auf die in die Milz eingewanderten humanen Immunzellen .....</b>	<b>85</b>
6.3.1 Hypothese 3.1: Der Monozyteninhibitor erniedrigt die Frequenz von Monozyten .....	85
6.3.2 Hypothese 3.2: Der Monozyteninhibitor inhibiert die T-Zellaktivierung.....	85
6.3.3 Hypothese 3.3: Der Monozyteninhibitor unterdrückt die Reifung von B-Zellen .....	86
<b>6.4 Ziel IV: PCA Analyse und Korrelation nach Pearson zur Bewertung der Effekte des Monozyteninhibitors im Tiermodell.....</b>	<b>87</b>
6.4.1 Hypothese 4.1: Die Testsubstanz ist wirksam im Mausmodell.....	87
<b>6.5 Ziel V: Wirkmechanismus der Testkomponente auf die Zytokinausschüttung und CRP.....</b>	<b>88</b>
6.5.1 Hypothese 5.1: Die Testkomponente erniedrigt die Zytokinausschüttung und CRP .....	88
<b>6.6 Ziel VI: Darstellung der Inflammation in der immun-histochemischen Färbung.....</b>	<b>89</b>
6.6.1 Hypothese 6.1: Die Inflammation ist auch in humanen Biopsien von Monozyten bestimmt .....	89
6.6.2 Hypothese 6.2: Die Wirkung der Testsubstanz wird in der Immunhistochemie deutlich.....	89
<b>6.7 Ziel VII: Monozyteninhibitor und Infliximab im Vergleich.....</b>	<b>90</b>
6.7.1 Hypothese 7.1: Die Wirkung von dem Monozyteninhibitor und Infliximab ist vergleichbar.....	90
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>93</b>
<b>8 Summary.....</b>	<b>95</b>
<b>9 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>10 Anhang .....</b>	<b>119</b>
<b>11 Danksagung .....</b>	<b>149</b>





## Abkürzungsverzeichnis

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
APC	<i>antigen presenting cell</i>
BCR	Rezeptor der B-Zelle
CCR2	Chemokinrezeptor auf Monozyten
CCL2	Chemokin-Ligand im entzündlichen Gewebe
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
CX3CR1	Chemokin Rezeptor
CRP	C-reaktives Protein (Entzündungsmarker)
DSS	Dextran Sodium Sulfat
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (engl.), Durchflusszytometrie
Foxp3	<i>forkhead box protein 3</i> (Transkriptionsfaktor)
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IgD	Immunglobulin D
IgM	Immunglobulin M
IHC	Immunhistochemische Färbung
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-13	Interleukin 13
Inflx.	Infliximab
JAK	Januskinase (Transkriptionsfaktor)
MASP	MBL-assoziierte Serinproteasen
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MGT	Masson-Goldner-Trichrom Färbung
MZ	Methylzellulose

MZ+TS	Testsubstanz
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer</i> (Transkriptionsfaktor)
NSG-UC	NOD-Scid IL2ry <sup>null</sup> (NSG)-UC Mausmodell
PAMPS	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PAS	Periodic acid-Schiff Färbung
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (engl.) Hauptkomponentenanalyse
PE	Phycoerythrin Farbstoff (FACS-Analyse)
PECy7	Phycoerythrin Cyanin 7 Farbstoff (FACS-Analyse)
PerCP Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein –Cyanin Farbstoff (FACS-Analyse)
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
ROR <sub>γ</sub> t	Transkriptionsfaktor
SCCAI	<i>Simple Clinical Colitis Activity Index</i>
STAT	Transkriptionsprotein ( <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
T-bet	Transkriptionsfaktor
T <sub>FH</sub>	<i>follicular helper T-Zelle</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TH1	T-Helferzelle Typ 1
TH2	T-Helferzelle Typ 2
TH17	T-Helferzelle, sekretiert IL-17
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSLPR	Rezeptor für TSLP
UC	<i>ulcerative colitis</i> (engl.), <i>Colitis ulcerosa</i>

## 1 EINLEITUNG

*Colitis ulcerosa* (ulcerative colitis, UC) ist eine chronische Darmerkrankung die das Kolon befällt. Beginnend vom Rektum breitet sich die Schleimhautentzündung kontinuierlich über das Kolon aus und ist durch Phasen von entzündlichen Schüben und Remission geprägt (Ungaro et al., 2017). Zu den charakteristischen Symptomen der *Colitis ulcerosa* zählen blutige Durchfälle sowie die rektale Exkretion von Blut. Zudem treten auch abdominale Schmerzen bis hin zu Krämpfen, Fieber und Gewichtsverlust auf. Extraintestinale Manifestationen in den Augen, der Haut oder den Gelenken treten vergleichsweise selten auf (Both et al., 1983).

Die medizinische Notwendigkeit neue Interventionspunkte in der UC Therapie zu finden ist sehr groß. Ein bisher nur wenig untersuchter Angriffspunkt der Behandlung sind die Monozyten. In einem Tiermodell wurde die Inhibition dieser Zielzellen getestet. Frühere Studien zeigten zwei Zuordnungen der Inflammation (Jodeleit et al., 2019): der „Wundheilungsarm“ vorrangig angetrieben durch Monozyten mit dem Ziel der Wundheilung, und der „Pro-Inflammationsarm“ vorangetrieben durch TH1 und TH2 Zellen, der den Schutz vor eindringenden Pathogenen gewährleistet. Da die bisher entwickelten Therapeutika vornehmlich den pro-inflammatorischen Arm adressieren, ist es zur vollständigen Unterdrückung der Inflammation notwendig, auch den Monozyten getriebenen Arm zu adressieren. Für diese Arbeit wurde ein Monozyteninhibitor in einem humanisierten Mausmodell evaluiert. Dieses Modell bietet die Möglichkeit, Therapeutika zu testen, die gegen humane Zielmoleküle gerichtet sind.



## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 *Colitis ulcerosa*

#### 2.1.1 *Definition*

*Colitis ulcerosa* ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung (Bak-Romaniszyn et al.) beginnend am Rektum mit einer kontinuierlichen, variablen Ausbreitung über das Kolon (Abraham et al., 2009). Die Erkrankung ist durch Schübe von Remission und Rückfall geprägt (Ungaro et al., 2017). Charakteristische Symptome der *Colitis ulcerosa* sind blutige Durchfälle und Tenesmen (Kucharzik et al., 2018).

#### 2.1.2 *Vorkommen*

Die Inzidenz in Europa an *Colitis ulcerosa* zu erkranken steigt kontinuierlich an: in Nordeuropa liegt sie bei 11,4 pro 100.000 und für Südeuropa bei 8,0 pro 100.000 (Shivananda et al., 1996). Aufgrund der Chronizität, dem frühen Beginn und der relativ niedrigen Mortalität steigt auch die Prävalenz der *Colitis ulcerosa* in Europa an: sie reicht von 2,4 bis 294 pro 100.000 (Burisch et al., 2013; Mak et al., 2020). In Deutschland liegt die Inzidenz für *Colitis ulcerosa* bei 3,0 bis 3,9 pro 100.000 (Dignass et al., 2011). Die Patienten werden vorwiegend im Alter zwischen 20-30 Jahren diagnostiziert, wobei ein zweiter Peak im Alter von 60-79 Jahren beobachtet wird (Mak et al., 2020). Die Anzahl der Neuerkrankungen ist in Europa unabhängig vom Geschlecht (Mak et al., 2020). Die Inzidenz der *Colitis ulcerosa* ist am höchsten in westlichen Ländern, obwohl die Lücke zwischen Ost und West kleiner wird, mit steigenden Zahlen in Asien und Osteuropa. (Mak et al., 2020).

#### 2.1.3 *Ätiologie*

*Colitis ulcerosa* ist ein multifaktorielles Krankheitsbild das durch ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren sowie mikrobiellen und immunmedierten Faktoren in einem genetisch empfänglichen Wirt entstehen kann (Glassner et al., 2020), siehe Abbildung 1.

### Genetik

In einer genomweiten Assoziationsstudie der europäischen Bevölkerung konnten 163 Genloki zur CED identifiziert werden, 23 davon speziell für die *Colitis ulcerosa* (Ye et al., 2016). Eine trans-ethnische Studie erhöhte die Nummer der Risikogene für CED auf 200 Genloki, mit 231 Variationen der Basenpaare (Liu et al., 2015). Der genetische Hintergrund definiert den Phänotyp der Krankheit (Tsianos et al., 2020). Unter anderem führt ein Polymorphismus des ECM1Gens zu einem schweren Verlauf der *Colitis ulcerosa* mit Gewebeschädigung (Fisher et al., 2008).

### Umweltfaktoren und Lebensstil

Der Hygiene Hypothese liegt die Annahme zugrunde, dass eine verminderte Exposition zu Mikroorganismen in der Kindheit, eine beeinträchtigte Immunantwort im späteren Leben zur Folge hat (Bloomfield et al., 2006). Zusätzlich spielt auch die Ernährung eine Rolle bei der Entstehung der *Colitis ulcerosa* (Dixon et al., 2015). Langkettige Triglyceride stimulieren die Entzündung durch einen erhöhten Lymphozyten Einstrom und einer erhöhten Expression von Entzündungsmediatoren (Miura et al., 1993). Übergewicht zählt nicht zu den Risikofaktoren, kann aber zu einem verschärften Krankheitsverlauf führen (Dixon et al., 2015). Interessanterweise hatte das regelmäßige Rauchen von Zigaretten eine schützende Wirkung im Bezug auf *Colitis ulcerosa*, jedoch steigerte es das Risiko an *Morbus Crohn* zu erkranken (Parkes et al., 2014).

### Mikrobiom

Das Mikrobiom, die Gesamtheit der Darmbakterien, spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung der *Colitis ulcerosa* (Glassner et al., 2020). Mit der Kolonisierung von Mäusen mit intestinaler Mikrobiota von CED Spendern konnte eine Ileitis ausgelöst werden (Schaubeck et al., 2016). Eine Reduzierung der Bakterienvielfalt, auch als „Dysbiose“ bezeichnet, wird mit Kolitis in Verbindung gebracht (Ledder et al., 2018). Meist wird eine Reduzierung von *Bacteroides* und *Lachnospiraceae* und eine Zunahme von *Enterobacteriaceae* beobachtet (Frank et al., 2007). Die fäkalen Bakterienpopulationen von Patienten mit inaktiver *Colitis ulcerosa* und gesunden Patienten ähneln sich, unterscheiden sich jedoch von der Mikroflora der Patienten mit aktiver *Colitis ulcerosa* (Andoh et al., 2011).

Immun-vermittelte Faktoren

Zu den Faktoren die das Immunsystem herabsetzen und die Entstehung einer Kolitis begünstigen zählt eine *Salmonella/Campylobacter* Gastroenteritis (Gradel et al., 2009).

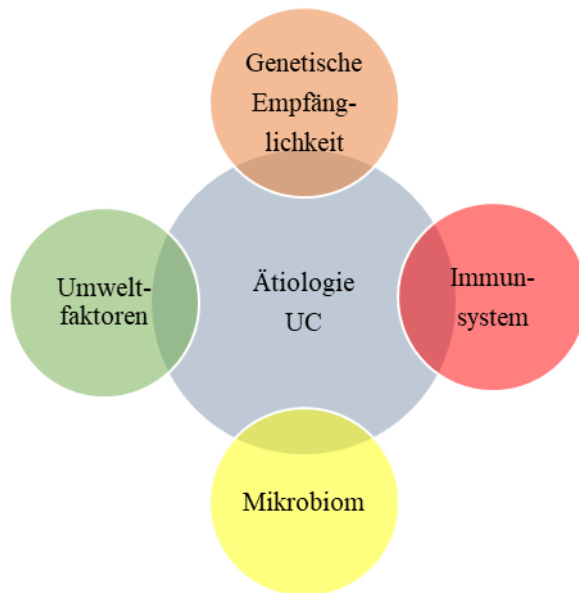


Abbildung 1: *Colitis ulcerosa als multifaktorielles Krankheitsbild*

*Colitis ulcerosa* entsteht durch ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren sowie mikrobiellen und immunmedierten Faktoren in einem genetisch empfänglichen Wirt (Glassner, Abraham, & Quigley, 2020).

#### 2.1.4 Pathogenese

Das multifaktorielle UC Krankheitsbild entsteht durch eine überschießende Immunreaktion des angeborenen Immunsystems gegen die Mikroflora des Kolons und resultiert in einer pathologischen Entzündungsreaktion, die zur Zerstörung der Darmschleimhaut führt (Kaur et al., 2020; Xavier et al., 2007). Eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese der *Colitis ulcerosa* spielt ein Zusammenbruch der Barrierefunktion der intestinalen Membran (Ungaro et al., 2017), siehe Abbildung 2.

Die erste zelluläre Barriere des Kolons ist eine Schicht aus Darmepithelzellen, an die sich das lymphatische Gewebe des Kolons in Form von Peyer'schen Platten anschließt (Shih et al., 2008). Spezialisierte Darmepithelzellen, die Paneth Zellen und die Goblet Zellen, produzieren antimikrobielle Proteine und Muzin, die zur Bildung der Mukusschicht beitragen (Ayabe et al., 2000; Kim et al., 2010). Bei *Colitis ulcerosa* Patienten führt die Dysregulation antimikrobieller Proteine, unter

anderem dem WFDC2, zu einer veränderten Mukusschicht (Parikh et al., 2019). Im Kolon ist der Mukus in 2 Schichten angeordnet (Johansson et al., 2016): die äußere Schicht ist mit der kommensalen Mikroflora besiedelt, während die innere Schicht nahezu steril und für Bakterien undurchdringbar ist. Patienten mit aktiver *Colitis ulcerosa* weisen eine geringere Frequenz der strukturgebenden Muzine MUC2 und FCGBP auf, resultierend in einer pathologisch dünnen und durchlässigen inneren Mukusschicht (Johansson et al., 2014; van der Post et al., 2019).

Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die *pattern recognition receptors* (PRR) können *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPS) erkennen, Strukturen von Mikroorganismen, und anschließend proinflammatorische Zytokine ausschütten (Meylan et al., 2006). Die PRR's des Gastrointestinaltraktes sind Toll-like Rezeptoren (TLR), die von Epithelzellen und den Immunzellen der darunter befindlichen *Lamina propria*, bestehend aus Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen, exprimiert werden (Akira et al., 2004). Bei Patienten mit aktiver *Colitis ulcerosa* kann eine erhöhte Expression des TLR2 Rezeptors nachgewiesen werden, der zu einer vermehrten Ausschüttung der Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$  führt (Kordjazy et al., 2018). Eine erhöhte Genexpression der TLR2, TLR4, TLR8 und TLR9 kann bei Patienten mit aktiver *Colitis ulcerosa* nachgewiesen werden (Sánchez-Muñoz et al., 2011). Aufgrund der Defekte in der intestinalen Mukosa können Mikroorganismen eindringen und eine verstärkte Immunreaktion auslösen (Stange et al., 2019).

Charakteristisch für eine aktive *Colitis ulcerosa* ist das Einströmen der Immunzellen des angeborenen Immunsystems, bestehend aus Neutrophilen, Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen, sowie die Aktivierung von B-Zellen und T-Zellen des erworbenen Immunsystems. Die Immunzellen schütten vermehrt Zytokine, bestehend aus TNF $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6, Interleukin-12 und Interleukin-23, sowie Chemokine aus (Abraham et al., 2009).



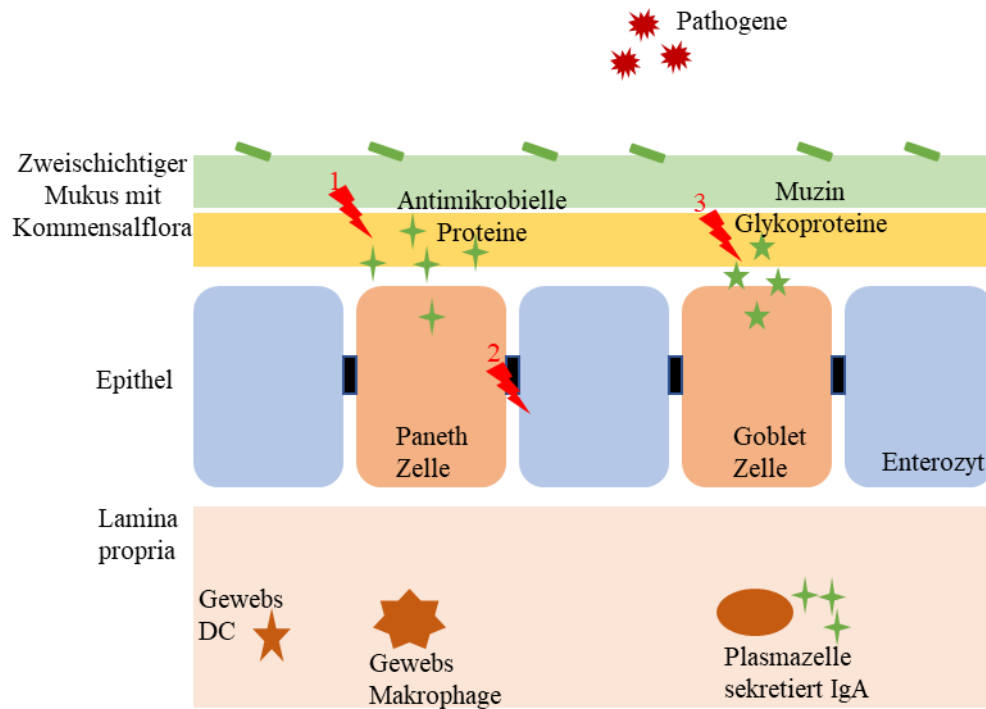


Abbildung 2: Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Colitis ulcerosa spielt ein Zusammenbruch der Barrierefunktion der intestinalen Membran (Ungaro et al., 2017).

Die Epithelzellen (blau) sind von einer zweischichtigen Mukusschicht bedeckt (hellgelb, hellgrün). Die äußere Lage des Mukus ist von kommensalen Bakterien besiedelt (grün). Spezialisierte Paneth Zellen sekretieren antimikrobielle Proteine und Gobletzellen produzieren Muzin Glykoproteine (grüne Sternchen). Die Epithelzellen sind untereinander mit *tight junctions* (schwarz) fest verbunden. Die *Lamina propria* (hellrosa) schließt sich der Epithelschicht an. In dieser Schicht liegen Gewebe Makrophagen, gewebespezifische dendritische Zellen und Plasmazellen, die physiologisch im Darm IgA sekretieren. Gestörte Funktionen bei *Colitis ulcerosa* sind mit einer Zacke markiert:

Zacke 1: gestörte Produktion von antimikrobiellen Proteinen

Zacke 2: gelockerte *tight junction* Verbindung zwischen den Zellen

Zacke 3: verminderte Produktion von Muzin Glykoproteinen

Folge: die gestörte Epithelschicht ermöglicht das Eindringen von Pathogenen. Immunzellen der *Lamina propria* werden aktiviert und eine Immunreaktion wird ausgelöst.



## 2.2 *Klinisches Erscheinungsbild*

### 2.2.1 *Diagnostik*

Die Diagnose der *Colitis ulcerosa* wird anhand von klinischen und endoskopischen Befunden, Laborparametern, Bildgebung sowie einer Histologie gestellt (Magro et al., 2017). Die Differenzierung zwischen *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* erfolgt aufgrund endoskopischer und histologischer Merkmale (Spiceland et al., 2018).

#### Klinische Symptome

Charakteristische Symptome der *Colitis ulcerosa* sind Diarrhoe, Tenesmen und die rektale Exkretion von Blut (Kucharzik et al., 2018). Abhängig vom Schweregrad der Erkrankung können auch nächtliche Diarrhoe, abdominelle Schmerzen und die Exkretion von Schleim auftreten (Feuerstein et al., 2019). Von der Ausbildung mindestens einer extraintestinalen Manifestation sind ca. 20% der *Colitis ulcerosa* Patienten betroffen. Die häufigste Extraintestinale Manifestation ist die periphere *Arthritis*, gefolgt von *Stomatitis* mit Aphtenbildung, axiale *Spondylitis*, *Uveitis*, *Erythema nodosum* und in seltenen Fällen die Ausbildung von *Psoriasis* (Vavricka et al., 2015)

#### Endoskopie

Für die Diagnosestellung wird die Ileokoloskopie mit Entnahme von Biopsien an Kolon, Rektum und terminalem Ileum empfohlen. Die histologische Beurteilung von entnommenen Biopsien ermöglicht die Differenzierung zwischen *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* (Magro et al., 2013). Makroskopisch zeigt sich eine oberflächliche Entzündung mit Ulzerationen beginnend am Rektum mit proximaler Ausbreitung, die sich klar vom gesunden Gewebe abgrenzen lässt. Die entzündete Mukosa stellt sich bröckelig und granulös dar (Sanders, 1998).

#### Laborparameter

Bei akuter *Colitis ulcerosa* sollten folgende Parameter im Labor untersucht werden (Kucharzik et al., 2018): inflammatorische Marker (C-reaktives Protein), ein Blutbild, Eisenhaushaltsparameter, Parameter der Nierenretention, Transaminasen und Parameter der Cholestase. Das C-reaktive Protein (CRP) gibt Rückschlüsse über den Ausbreitungsgrad der chronischen Entzündung und korreliert mit den klinischen Symptomen (Rodgers et al., 2007). Zu den Entzündungsmarkern zählen

aufgrund erhöhter Permeabilität ein gesteigerter Proteinverlust im Darm sowie eine erhöhte Frequenz an Enzymen und Zytokinen, die von eingewanderten Neutrophilen in die entzündete Mukosa ausgeschüttet werden. Ein Anstieg an Lysozymen, Lactoferrinen, TNF $\alpha$  und Calprotein ist charakteristisch für die *Colitis ulcerosa* (Poullis et al., 2002). Die Messung des faecalen Calproteins ist der sensitivste Marker zur Diagnose der *Colitis ulcerosa* (Mindemark et al., 2012). Durch chronischen Blutverlust aufgrund blutiger Durchfälle kommt es zur Anämie, dabei liegen die kritischen diagnostischen Parameter bei einem Serum Ferritin >100 $\mu$ g/L und einer Transferritin Sättigung <20% (Chaubal et al., 2017)

### Histopathologie

Die endoskopische Einschätzung der Mukosa für die Diagnostik spielt bei der *Colitis ulcerosa* in der akuten Phase sowie während der Remission eine entscheidende Rolle (Mohammed et al., 2016). In vielen klinischen Studien wird der Geboes Score zur Bewertung der histopathologischen Proben angewendet (Mayer et al., 2014). In Phasen der Remission können histologische Marker der Inflammation, bestehend aus einer erhöhten Frequenz an Plasmazellen, Lymphozyten und chronischen Entzündungsinfiltraten, in endoskopisch unauffälliger Mukosa das Risiko für einen erneuten Rückfall anzeigen. Der Prozentsatz der *Colitis ulcerosa* Patienten in Remission, die einen erneuten Krankheitsschub bekommen, liegt bei 20 bis 57,7% (Mohammed et al., 2016).

### 2.2.2 Klassifizierung

*Colitis ulcerosa* kann basierend auf der Ausbreitung der kolorektalen Inflammation nach einem modifizierten Protokoll von (Silverberg et al., 2005) in drei Untergruppen eingeteilt werden, siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Klassifizierung der *Colitis ulcerosa* anhand des Ausbreitungsgrades

Bezeichnung	Ausbreitungsgrad	Beschreibung
E1	Ulzerative Proktitis	Proktitis beschränkt sich auf das Rektum, die proximale Ausbreitung reicht bis zum rektosigmoidalen Übergang
E2	Linksseitenkolitis	Kolitis ist im distalen Kolon begrenzt und reicht bis zur linken Kolonflexur
E3	Pankolitis	Ausbreitung reicht bis proximal der linken Kolonflexur

Die Montréal Klassifikation beschreibt den Schweregrad der *Colitis ulcerosa* basierend auf einem modifizierten Protokoll nach (Satsangi et al., 2006), vergleiche Tabelle 2.

Tabelle 2: Montréal Klassifikation zur Beurteilung des Schweregrades der *Colitis ulcerosa*

Schweregrad	Klinik	Definition
S0	Remission	asymptomatisch
S1	mild	<4 Stuhlgänge pro Tag (mit oder ohne Blut), keine systemische Erkrankung, Inflammationsmarker im Normalbereich
S2	moderat	>4 Stuhlgänge/Tag mit ersten Anzeichen einer systemischen Toxizität
S3	schwer	>6mal pro Tag blutiger Durchfall, Pulsrate von 90 pro Minute, Temperatur bei 37,5°C, Hämoglobin fällt auf 10,5g/100ml

### 2.2.3 Verlauf der *Colitis ulcerosa*

Die Mehrzahl der Patienten zeigen, nach der initialen Aktivität zum Zeitpunkt der Diagnose, milde Symptome oder befinden sich in Remission (Solberg et al., 2009). Eine aggressive Verlaufsform wird bei 10-15% der Patienten angenommen und das Risiko eines Rückfalls liegt bei 70-80% in 10 Jahren (Fumery et al., 2018). Patienten mit aktiver *Colitis ulcerosa* leiden unter der rektalen Exkretion von Blut und Schleim, sowie Tenesmen, nächtlicher Defäkation und krampfhaften abdominalen Schmerzen (Rao et al., 1988). Zur Beurteilung der Schleimhaut während der Endoskopie werden verschiedene Scoring Systeme angewendet (Peyrin-Biroulet et al., 2016): der Mayo Score wurde 1987 von K. Schroeder (Schroeder et al., 1987) entwickelt und wird in der Mehrheit der Fälle verwendet. Der Mayo Score bewertet mit einem 12-Punkte-System die Stuhlkonsistenz, rektale Blutungen, endoskopische Befunde und klinische Befunde (Feuerstein et al., 2020). S. Truelove und L. Witts definierten 1955 Kriterien die zur Beurteilung des Schweregrades der aktiven *Colitis ulcerosa* anhand klinischer Symptome dienen (Truelove et al., 1955). Eine Indikation zur Operation besteht bei Patienten mit akuter *Colitis ulcerosa* bei Perforation oder einer therapieresistenten, fulminanten *Kolitis*, während Patienten in Remission bei Dysplasien oder Strikturen operiert werden (Cohen et al., 2005). Die Wahrscheinlichkeit einer Operation liegt bei 5 und 10 Jahresstudien bei 10-15%, obwohl eine Rate früher Kolektomien bekannt ist bleibt sie über längeren Zeitraum konstant (Fumery et al., 2018).

### 2.2.4 Therapie

Das Therapieziel der *Colitis ulcerosa* ist eine schnelle Remission zu erzielen und zu erhalten sowie eine weitere Ausbreitung der chronischen Entzündung zu verhindern (Pineton de Chambrun et al., 2018). Zur Einstufung des Schweregrades der *Colitis ulcerosa* können die Truelove und Witt's Kriterien sowie der Mayo Score angewendet werden (Schroeder et al., 1987; Truelove et al., 1955).

Zu Beginn der Diagnose wird bei Patienten mit milden bis moderaten Verlauf die Therapie mit 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) begonnen um das Stadium der Remission zu erlangen und zu erhalten (Fumery et al., 2018). Sulfasalazine, Olsalazine und Balsalazine sind Vorstufen die von den Bakterien zu 5-ASA umgewandelt werden (Sandborn et al., 2003). Empfohlen wird Patienten mit umfangreicher milder bis moderater *Colitis ulcerosa* mit Mesalamin oder *prodrugs* (diazo gebundene 5-ASA's) zu therapieren (Ko et al., 2019). Patienten die nicht auf

die orale Gabe von 5-ASA ansprechen, sollten zudem rektal mit 5-ASA therapiert werden (Lamb et al., 2019). Die antiphlogistische Wirkung beruht auf der Hemmung der Cyclooxygenase 1 und 2.

Eine kombinierte Therapie mit Kortikosteroiden und 5 ASA wird für Patienten empfohlen die nicht auf die Monotherapie mit ASA ansprechen (Truelove et al., 1962). Budesonide weisen im Vergleich zu anderen Kortikosteroiden geringere Nebenwirkungen auf und erzielen als rektale Anwendung von vorzugsweise Schaum-Präparaten einen anti-inflammatorischen Effekt bei Patienten mit mildem bis moderaten Verlauf (Sandborn et al., 2015).

Zur Therapie der moderaten bis schweren *Colitis ulcerosa* stehen verschiedene Wirkstoffklassen zur Induktion und Erhaltung der Remission zur Verfügung. Die Therapie sollte zunächst mit einem TNF $\alpha$ -Inhibitor (Infliximab) oder einem Integrin-Antagonisten (Vedolizumab) begonnen werden und bei fehlendem Therapieerfolg auf den Janus Kinase Inhibitor (Tofacitinib) gewechselt werden (Feuerstein et al., 2020). Zur Remissionserhaltung kann die Therapie mit Thiopurinen fortgeführt werden (Lamb et al., 2019). Bei einem erneuten schweren Krankheitsschub wird die Therapie mit Infliximab oder Cyclosporinen empfohlen (Feuerstein et al., 2020). Die AGA (American Gastroenterological Association) empfiehlt, aufgrund des variablen Therapieerfolges bei Infliximab, eine Bestimmung des Medikamentenspiegels bei Patienten mit aktiver *Colitis ulcerosa* in Behandlung mit dem TNF $\alpha$  Inhibitor (Feuerstein et al., 2017).

Die etablierte Operationsmethode der Proktokolektomie mit ileopouchanaler Anastomose wird bei einer therapieresistenten *Kolitis* trotz Immunsuppressiva-Therapie sowie bei Neoplasien oder kolorektalem Krebs angewendet (Cohen et al., 2005). Die Operationsmethode wurde 1978 erstmals von A. Parks in London angewendet (Parks et al., 1978). Bei der dreistufigen Operationsmethode wird im ersten Schritt das Kolon entfernt und eine endständige Ileostoma angelegt, im zweiten Schritt eine Ileal-Pouch aus dem Dünndarm geformt mit pouch-analer Anastomose und Loop-Ileostoma. Nach Abheilung kann das Loop-Ileostoma zurückverlegt werden (Bednarz et al., 2005).

### 2.2.5 Spätfolgen

Nach einer Proktokolektomie mit ileopouchanaler Anastomose kann als Komplikation eine *Pouchitis* auftreten (Pemberton et al., 1987). Risikofaktoren für die Ausbildung einer *Pouchitis* ist ein junges Alter bei der Operation und extraintestinale Manifestationen (Ferrante et al., 2008).

Ein langjähriger Krankheitsverlauf der *Colitis ulcerosa* erhöht das Risiko an kolorektalem Krebs zu erkranken, es liegt nach 20 Jahren bei 8,3% und nach 30 Jahren bereits bei 18,4%. (Bernstein et al., 2001; Yashiro, 2014). Zu den Risikofaktoren zählen ein junges Alter bei Diagnosestellung, extraintestinale Manifestationen, anatomische Ausbreitung der *Kolitis* sowie eine genetische Komponente (Yashiro, 2014). Eine regelmäßige Kolonoskopie und Biopsie bietet die Möglichkeit schon früh Dysplasien zu erkennen, die bereits ein Anzeichen für gebildete Krebszellen sein können (Bernstein et al., 1994).



## 2.3 Immunologie

### 2.3.1 Angeborene Immunität

Die Mechanismen der angeborenen Immunität reagieren sofort mit einer unspezifischen Immunantwort auf eindringende Pathogene. Das angeborene Immunsystem des Gastrointestinaltraktes verfügt über verschiedene Mechanismen um die *Homeostase* aufrecht zu erhalten. Die Epithelzellen spielen eine Schlüsselrolle, indem sie zusätzlich zur physikalischen Barriere eine chemische Barriere durch Sekretion von antimikrobiellen Peptiden schaffen (Zasloff, 2002). Paneth Zellen sekretieren  $\alpha$ -Defensine, Phospholipase A und Lysozym C zur Zerstörung der Bakterienmembran (Bevins et al., 2011). Zur Schutzfunktion der Epithelzellen zählen eine erhöhte Ausschüttung antimikrobieller Proteine sowie des Interleukin-8 zur Anlockung von Neutrophilen auf die basale Seite (Sansonetti, 2004). Das Mannose-bindende Lektin (MBL), zugehörig zum Komplementsystem, bindet an MBL-assoziierte Serinproteasen (MASP) der Bakterienmembran und führt zur Zellyse oder kann pathogene Zellen direkt opsonieren und Phagozytose durch Makrophagen induzieren (Bak-Romaniszyn et al., 2020).

Die zelluläre Immunantwort wird ausgelöst wenn *toll-like receptors* (TLR) auf der Oberfläche der Epithelzellen des Kolons die *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) eines eindringenden Pathogens erkennen (Janeway et al., 2002). Die TLR's aktivieren intrazelluläre Signalkaskaden, unter anderem die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP-1, die zur Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, Typ I Interferonen und Chemokinen führen (Kawai et al., 2007). Dies führt zur Aktivierung von Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen, Neutrophilen, Eosinophilen und natürlichen Killerzellen, die als kurzlebige Effektorzellen die Pathogene bekämpfen (Janeway et al., 2002).

### 2.3.2 Die Rolle der Monozyten und Makrophagen

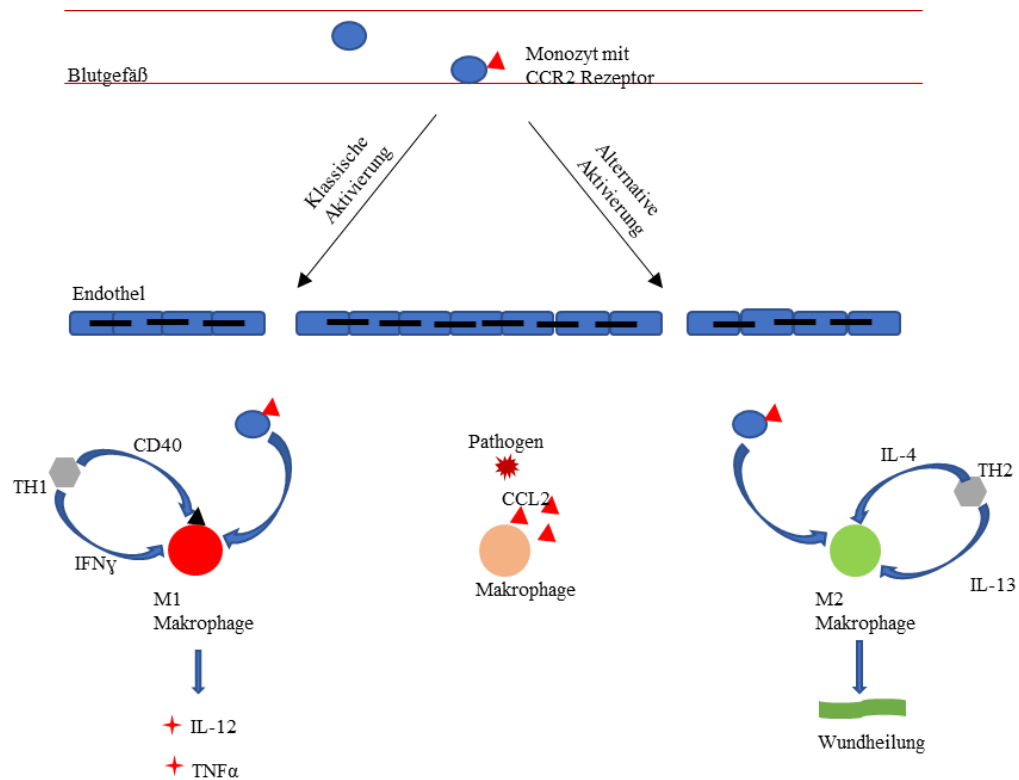
Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen bilden das *mononuclear phagocyte system* und zeichnen sich durch eine gemeinsame Vorläuferzelle, der *common myeloid progenitor* (CMP) im Knochenmark, sowie phagozytischer Eigenschaften aus (Guilliams et al., 2018; van Furth et al., 1972). Während einer Infektion oder Entzündung werden Monozyten durch Chemokine aus dem Blut in das entzündliche Gewebe angelockt, wo sie sich abhängig vom Milieu zu Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren und das adaptive

Immunsystem aktivieren (C. V. Jakubzick et al., 2017).

Die murinen und humanen Monozyten entstehen im Knochenmark und zirkulieren als zwei große Populationen im Blut (Zhao et al., 2018): klassische Monozyten, die den Korezeptor CD14 exprimieren ( $CD14^{++}CD16^{-}CCR2^{+}$ ) bilden mit 90% den größten Anteil zirkulierender humaner Monozyten. Die äquivalente Monozytenpopulation in der Maus exprimiert hohe Level an Ly6C ( $Ly6C^{high/+}CD43^{+}CX3CR1^{-/low}$ ). Den kleineren Anteil stellen die nicht klassischen Monozyten dar, die beim Menschen CD14 und CD16 auf ihrer Oberfläche exprimieren ( $CD14^{+}CD16^{++}CCR2^{-}$ ) sowie eine geringe Frequenz an Ly6C ( $Ly6C^{low/-}CD43^{high/+}CX3CR1^{+/high}$ ) bei der Maus, und entlang des Endothels rollen. Die Übergangsform zwischen klassischen und nicht klassischen Monozyten stellen die intermediären Monozyten dar, die auch bereits den Fc Rezeptor CD16, exprimieren ( $CD14^{++}CD16^{+}CCR2^{+}$ ) sowie eine hohe Frequenz an Ly6C und CD43 in der Maus ( $Ly6C^{high/+}CD43^{high/+}$ ). Klassische Monozyten wandern als inflammatorische Monozyten mittels Expression des CCR2 Rezeptors in entzündetes Gewebe ein und binden dort an das Chemokin CCL2. (Marsh et al., 2017). Die nicht klassischen Monozyten verbleiben im Blutstrom, sind zuständig für die Wundheilung und wirken anti-inflammatorisch mit einer erhöhten Expression des CX3CR1 Rezeptors und LFA-1 Integrin (Auffray et al., 2007). Die intermediären Monozyten verlassen entweder die Blutlaufbahn durch Migration oder differenzieren zu nicht klassischen Monozyten (Patel et al., 2017).

Im Gewebe angesiedelte Makrophagen entstehen während der Embryonalentwicklung oder differenzieren sich aus Monozyten, die ins Gewebe einwandern (Orecchioni et al., 2019). T-Zellen bestimmen durch Sekretion von Zytokinen den Typ der Immunantwort. TH1 Zellen schütten  $IFN\gamma$  aus und exprimieren den CD40 Rezeptor, daraufhin wird die Differenzierung von proinflammatorischen M1 Monozyten angeregt (Mills et al., 2000; Vaitaitis et al., 2017). Inflammatorische M1 Makrophagen sekretieren  $TNF\alpha$  und IL-12 um weitere Effektorzellen anzulocken (Mills et al., 2000). TH2 Zellen schütten IL-4 und IL-13 aus, die den alternativen Weg der Aktivierung anregen und in der Differenzierung von M2 Makrophagen resultieren, siehe Abbildung 3. Die Funktion der M2 Monozyten ist die Wundheilung, sie regulieren das Ausbilden von Bindegewebe und Gefäßen (Gordon, 2003). In Tierstudien zu Nierenerkrankungen konnte gezeigt werden, dass Makrophagen ihren Phänotyp anpassen können. Bei renaler Fibrose kommen

vermehrt M2 Monozyten vor (Tang et al., 2019). In einer Studie zur Nephropathie wurde deutlich das M2 Makrophagen mit den Oberflächenmarkern CD163+ und CD204+ vermehrt in fibrotischem Gewebe auftraten (Ikezumi et al., 2011). Die Interleukine IL-4 und IL-13, die zur alternativen Aktivierung von T-Zellen sekretiert werden, und ihre Rezeptoren werden vermehrt bei Lungenfibrose exprimiert (C. Jakubzick et al., 2004).



*Abbildung 3 Auswanderung der Monozyten in inflammatorisches Gewebe und Differenzierung zu M1 und M2 Makrophagen.*

Links: Klassisch aktivierte M1 Makrophage. Rechts: Alternativ aktivierte M2 Makrophage. Ein Pathogen dringt durch das Endothel des Kolons. Makrophagen schütten daraufhin CCL2 aus. Monozyten können mithilfe ihres CCR2 Rezeptors aus dem Blutgefäß zur Inflammation wandern. Eine TH1 Immunantwort führt zur Ausbildung von M1 Monozyten (links). TH1 Zellen exprimieren den CD40 Rezeptor und schütten IFN $\gamma$  aus, woraufhin der Monozyt zur M1 Makrophage differenziert. Die proinflammatorische M1 Makrophage schüttet IL-12 und TNF $\alpha$  aus. Eine TH2 Immunantwort führt zur Ausbildung von M2 Makrophagen (rechts). TH2 Zellen schütten IL-4 und IL-13 aus, Monozyten differenzieren zu M2 Makrophagen. Die M2 Makrophage fördert die Wundheilung.

### 2.3.3 Erworbene Immunität

Eine erworbene Immunantwort wird ausgelöst, wenn Pathogene die Abwehrreaktionen der angeborenen Immunität überwinden. Zu den Effektorzellen des erworbenen Immunsystems gehören die T-Zellen, die im Thymus reifen, und die B-Zellen, die im Knochenmark gebildet werden (Fistonich et al., 2018; Owen et al., 2019). Die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses in Form von *memory* Zellen der B-Zellen sowie der CD4 und CD8 T-Zellen sorgt für eine schnellere und effektivere Immunantwort bei erneutem Kontakt eines Antigens (Kirman et al., 2019).

Die zelluläre Immunantwort bilden naive T-Zellen, die sich in verschiedene Klassen von Effektor T-Zellen differenzieren (Bonilla et al., 2010; Hirahara et al., 2016): die CD8 T-Zellen erkennen Antigen Peptide die an MHCI gebunden sind und differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen. Die CD4 T-Zellen binden an pathogene Peptide der Klasse MHCII und differenzieren zu T-Helfer Zellen (TH1, TH2, TH17), T folliculäre Helfer Zellen (T<sub>FH</sub>) und T regulatorischen Zellen (T<sub>reg</sub>). Die humorale Immunantwort bilden B-Zellen, die sich zu Plasmazellen differenzieren und spezifische Antikörper sezernieren (Bonilla et al., 2010).

#### T-Zellen

Die Aktivierung der naiven T-Zellen, das *priming*, beginnt wenn dendritische Zellen ein spezifisches Antigen als MHC Komplex für die Bindung an den TCR Rezeptor und das Molekül B7 für die Bindung an CD28 der T-Zelle exprimieren (Gibbons et al., 2014; Zou et al., 2018). Nach der Aktivierung folgt die Differenzierung der T-Zellen (Shouse et al., 2019; Swiecki et al., 2015): dendritische Zellen schütten Zytokine aus, die spezielle *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) Transkriptionsproteine der T-Zellen aktivieren und die Ausprägung der Effektorzellen bestimmen. Zusätzlich locken dendritische Zellen, durch Sekretion von Chemokinen, weitere Immunzellen zum entzündlichen Geschehen an (Swiecki et al., 2015).

TH1-Zellen differenzieren sich aus naiven T Zellen, wenn die Zytokine IFN $\gamma$  und IL12 das STAT1 Protein aktivieren sowie IL12 das STAT4 Transkriptionsprotein, die wiederum zur Expression des Transkriptionsfaktors T-bet führen (Ghoreschi et al., 2011; Pritchard et al., 2019). T-bet unterstützt die optimale Interaktion zwischen den T Zellen während des *priming* (Pritchard et al., 2019). TH1-Zellen schütten bei

Antigenkontakt IFN $\gamma$  aus und aktivieren proinflammatorische M1 Makrophagen die daraufhin Zytokine, unter anderem TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 und IL23 sezernieren, und durch Aktivierung des *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) Oxidase Systems intrazelluläre Pathogene lysieren (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

TH2-Zellen differenzieren sich unter dem Einfluss des Interleukins 4 (IL4), welches STAT6 aktiviert, woraufhin STAT6 den Transkriptionsfaktor GATA3 exprimiert (Kaplan et al., 1996; Stark et al., 2019). TH2 Zellen sezernieren IL-4, IL-5 und IL-13 (Watanabe et al., 2020). Durch die Ausschüttung von Interleukin 4 regen die TH2 Zellen die B Zellen an IgE zu produzieren (Kopf et al., 1993). Die Sekretion von IL-4 und IL-13 aktiviert Makrophagen und IL-5 induziert die Eosinophilie im Gewebe (Coffman et al., 1989; Gordon, 2003). Eine TH2-Immunantwort wird durch Helminthen ausgelöst und TH2-Zellen spielen eine entscheidende Rolle die Schädigung des Gewebes und die Entzündung infolge der Parasiten zu minimieren, indem sie unter anderem Neutrophile und Makrophagen aktivieren. Eine chronische TH2-Immunantwort führt zur Ausbildung von fibrotischem Gewebe (Chen et al., 2012). Anti-inflammatorische M2 Makrophagen werden durch die TH2-Zytokine IL-4 und IL-13 aktiviert und sezernieren IL-10 und TGF $\beta$  um die Entzündung zu unterdrücken und die Wundheilung einzuleiten (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

TH17-Zellen entstehen, wenn die Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF $\beta$ ) bei der Aktivierung naiver T-Zellen dominierend sind (Dong, 2008). IL-6 aktiviert das Transkriptionsprotein STAT3, welches den Transkriptionsfaktor *retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$*  (ROR $\gamma$ t) induziert und zur Differenzierung von TH17-Zellen führt (Durant et al., 2010; Fasching et al., 2017). Charakteristisch für TH17-Zellen ist eine erhöhte Expression des Rezeptors IL-23R (Lee et al., 2012). TH17-Zellen sekretieren IFN $\gamma$ , IL22, IL-17A, IL-17F sowie IL-21 und spielen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der *Homeostase* im Gastrointestinaltrakt indem sie extrazelluläre Bakterien und Pilze durch die Ausschüttung von Interleukin-17 bekämpfen (Ueno et al., 2018).

Regulatorische T-Zellen (T<sub>Reg</sub>) exprimieren den Transkriptionsfaktor *forkhead box protein 3* (Foxp3) und das Oberflächenmolekül CD 25 (Raffin et al., 2020). T<sub>Reg</sub> Zellen unterdrücken die Immunantwort und Inflammation durch Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF $\beta$ , wodurch die CD4<sup>+</sup>

Immunantwort kontrolliert wird (O'Garra et al., 2004). Natürliche T<sub>Reg</sub> Zellen (nT<sub>Reg</sub>) differenzieren sich im Thymus, wohingegen die induzierten regulatorischen T-Zellen (iT<sub>Reg</sub>) aus naiven T-Zellen im Zytokin-Milieu von IL-2 und *transforming growth factor* (TGFβ) gebildet werden (Josefowicz et al., 2012; Kanamori et al., 2016). Das Interleukin IL-6 reguliert die Differenzierung naiver T-Zellen im TGFβ Zytokin Milieu in entweder regulatorische T-Zellen oder TH17-Zellen (Eikawa et al., 2010): eine hohe Frequenz an IL-6 fördert die Differenzierung von TH17-Zellen, während eine niedrige Expression die Entstehung regulatorischer T-Zellen begünstigt. Bei *Colitis ulcerosa* Patienten kann eine erhöhte Frequenz an IL-6 im Serum und eine vermehrte Anzahl an TH17-Zellen einhergehend mit einer verminderten Anzahl an regulatorischen T-Zellen beobachtet werden, sodass eine Chronizität der Entzündung begünstigt wird (Zhu et al., 2017).

### B-Zellen

Naive B-Zellen binden mit dem BCR Rezeptor auf ihrer Oberfläche ein passendes Antigen das von APC Zellen (*antigen presenting cells, APC*) präsentiert wird und benötigen zur Aktivierung zusätzliche Signale die entweder durch mikrobielle Bestandteile oder thymus-abhängig von *follicular helper* T-Zellen (T<sub>FH</sub>) geliefert werden (Abos et al., 2020). Die Aktivierung der T-Zelle setzt die Präsentation des Antigens als MHCII Komplex der B-Zelle voraus (Hernández-Pérez et al., 2019). Wenn die T-Zelle den Komplex erkennt, exprimiert sie den Liganden CD40L und sekretiert IL-21, das wiederum STAT-3 der B-Zellen aktiviert und zur Proliferation führt (Abos et al., 2020). Aus den naive B-Zellen differenzieren sich entweder zu *memory* B-Zellen oder Plasmazellen die Immunglobuline sekretieren (Eibel et al., 2014). Patienten mit *Colitis ulcerosa* weisen eine erhöhte Frequenz an B-Zellen in der entzündeten Mukosa auf (Jinno et al., 2006). Die Entwicklung der B-Lymphozyten beginnt im Knochenmark. Die ersten Antigen Rezeptoren die von B-Zellen exprimiert werden sind Immunglobulin M (IgM) und Immunglobulin D (IgD), mit denen die ungereiften B-Zellen gekennzeichnet sind (Rajewsky, 1996).

### Immunprofilierung von UC Patienten

Die Inflammation in UC Patienten ist ein dynamischer Prozess, der auf der Interaktion von Epithelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen mit Immunzellen beruht. Wie im Wundheilungsprozess muss das geschädigte Epithel vor eindringenden Pathogenen geschützt werden. Die Immunprofilierung von UC

---

Patienten zeigte zwei dieser Zustände. Der pro-inflammatorische Arm ist durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, TH1- und TH2-Zellen sowie maturierte B-Zellen charakterisiert. Der sogenannte Wundheilungsarm hingegen durch M1 und M2 Monozyten sowie durch TH17-Zellen (Jodeleit et al., 2019; Jodeleit et al., 2017).





## 2.4 Tiermodelle der *Colitis ulcerosa*

### Chemisch induzierte Colitis Ulcerosa

Tiermodelle mit chemisch induzierter *Colitis ulcerosa* werden am häufigsten verwendet und eignen sich zum Verständnis pathophysiologischer Vorgänge sowie zur Testung von Therapeutika in der präklinischen Phase (Wirtz et al., 2007).

Bei der Dextran Sodium Sulfat (DSS)-induzierten Kolitis wird das Polysaccharid den Mäusen oral über das Trinkwasser gegeben und wirkt toxisch auf die Epithelzellen des Kolons (Eichele et al., 2017). Die Entzündung wird ausgelöst, wenn Bakterien oder bakterielle Antigene durch die geschädigte Epithelschicht des Darmes in die *Lamina propria* eindringen und dort Makrophagen und Neutrophile aktivieren, die wiederum proinflammatorische Zytokine sekretieren (Kiesler et al., 2015). Das Tiermodell eignet sich zur Auslösung chronischer sowie akuter *Kolitis* abhängig von der jeweiligen Konzentration, die zwischen 1-5% liegt, sowie Dauer und Frequenz der DSS-Gabe (Eichele et al., 2017; Mizoguchi et al., 2020): eine 4-7 tägige Gabe von 3-5% führt zu einer akuten Verletzung des Epithels mit Kryptverlust im distalen Kolon. Die 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-induzierte *Kolitis* wird durch die rektale Applikation von TNBS in 50% Ethanol ausgelöst und führt zu einer chronischen *Kolitis* mit Infiltration von CD4+ Zellen und Sekretion von IL-2 und IFN- $\gamma$ , Zytokine einer TH1-Immunantwort (Neurath et al., 1995). Die Oxazolone induzierte *Kolitis* wird durch rektale Applikation von Ethanol und Oxazolone induziert und löst eine TH2-Immunantwort aus mit einer erhöhten Sekretion von IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 (Wirtz et al., 2007).

#### 2.4.1 Mäuse mit humanem Immunsystem

Humanisierte Mausmodelle basieren auf der Transplantation funktionaler humaner Zellen oder Gewebe in immun defiziente Mäuse und spielen eine große Rolle in der präklinischen Forschung (Walsh et al., 2017). Die ersten Mäuse mit einem unvollständig ausgebildeten Immunsystem, entdeckt 1962 von S.P. Flanagan bei Untersuchungen an Nacktmäusen, zeigten eine eingeschränkte T-Zellfunktion (Flanagan, 1966). Der SCID Mausstamm wurde 1983 entdeckt und zeichnet sich durch ein schweres Immundefizit aus, basierend auf einer unvollständigen Ausbildung von T- und B-Zellen (Bosma et al., 1983). Mutierte Tiere weisen weitere Immundefizite auf (Leiter, 1993): NOD-Mäuse bilden weder natürlichen Killerzellen aus noch verfügen sie über ein Komplementsystem im Blut. NOD/Scid

Mäuse, die humane Lymphozyten appliziert bekamen, zeigen ein erhöhtes Einwandern von humanen CD4+ und CD8+T- Zellen sowie humanen Leukozyten in Milz und Blut (Greiner et al., 1995). Studien zu Mäusen die zusätzlich zur Immundefizienz Mutation (SCID) eine Mutation des Allels Interleukin-2R $\gamma$  aufwiesen zeigten, dass sich die Tiere durch ein hohes Ansiedeln humaner Zellen in Milz, Knochenmark und Blut sehr gut für humanisierte Modelle eignen (Ito et al., 2002). Mutationen der  $\gamma$ -Kette des IL-2 Rezeptors führen zu keiner Ausbildung von natürlichen Killerzellen und einer gestörten Signalvermittlung des IL-2, IL-4, IL-7 und IL-9. Menschen mit diesem Gendefekt entwickeln eine schwere Immunsuppression (XSCID), bei Mäusen kann eine verringerte Ausbildung vom Thymus sowie eine fehlende Entwicklung von dendritischen Zellen, T-Zellen und GALT beobachtet werden (Cao et al., 1995). Für die Studie dieser Arbeit wurde das NOD-SCID IL2r $\gamma^{null}$  (NSG)-UC Mausmodell verwendet, bei dem die Mäuse mit den *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) von *Colitis ulcerosa* Patienten rekonstituiert werden. Nach rektaler Ethanol Applikation bilden die Mäuse *Kolitis* Symptome aus, die der Erkrankung des Menschen ähneln (Palamides et al., 2016). Da der immunologische Hintergrund des Spenders bis zu einem gewissen Grad erhalten bleibt, bietet dieses Modell die Möglichkeit, die Wirksamkeit eines Therapeutikums in Subgruppen von Patienten zu testen. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die mit PBMCs von Patienten rekonstituiert wurden, die ein pro-inflammatorisches Profil aufwiesen, besser auf den anti-TNF $\alpha$  Antikörper Adalimumab ansprachen (Jodeleit et al., 2019). Mäuse, die hingegen mit PBMCs von Patienten rekonstituiert wurden, die eine höhere Frequenz des OX40L auf Monozyten aufwiesen, sprachen auf den Antikörper Oxelumab an, der gegen diesen Liganden gerichtet ist (Jodeleit, Winkelmann, et al., 2020). Ziel dieser Arbeit war, dieses Tiermodell zu nutzen, um spezifisch den Monozyten getriebenen Arm der Inflammation zu unterdrücken. Dazu wurden Patienten ausgewählt, die im Immunprofil eine durch Monozyten geprägte Inflammation aufwiesen.

### 3 ZIELFÜHRUNG DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Testung eines neuen Wirkmechanismus, der spezifisch auf das Immunprofil der Spender angepasst ist. In der Literatur werden zwei inflammatorische Subgruppen der *Colitis ulcerosa* beschrieben: zum einen eine proinflammatorische Gruppe mit einer erhöhten Anzahl an TH1- und TH2-Zellen sowie B-Zellen nach Klassenwechsel, und zum anderen eine Gruppe die den Wundheilungsprozess widerspiegelt mit einer erhöhten Anzahl an M1 Monozyten und TH17-Zellen (Jodeleit et al., 2019). Die Testkomponente adressiert spezifisch in die Inflammation während des Wundheilungsprozesses, ihr Wirkmechanismus beruht auf der Inhibition der Monozyten. Die Wirkung der Testkomponente wurde im NSG-UC Mausmodell untersucht. Dafür wurden zwei Spender ausgewählt, die eine hohe Frequenz an M1 Monozyten und TH17-Zellen aufwiesen. Zur Rekonstitution wurden die PBMCs der Spender isoliert und anschließend den Mäusen appliziert. Die Wirksamkeit des Inhibitors wurde zunächst anhand eines klinischen-, Darm- und histologischen Scores im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe beurteilt. Zusätzlich wurde die Wirkung des Inhibitors auf die humanen Leukozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Schließlich wurden Effekte auf die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen in Kolonextrakten mittels Luminex Analyse ermittelt. Die Wirksamkeit des Monozyteninhibitors wurde mit der von Infliximab verglichen. Infliximab ist ein monoklonaler anti-TNF $\alpha$  Antikörper, der ein etabliertes Therapeutikum bei moderater bis schwerer *Colitis ulcerosa* ist (Singh, Allegretti, Siddique, & Terdiman, 2020). Als Kontrollgruppe diente eine mit Isotyp behandelte Gruppe. Zur Darstellung der Monozyten-getriebenen Inflammation wurden Biopsien des Spenders, sowie die histologischen Schnitte des Kolons aus den einzelnen Gruppen mit einer IHC-Färbung angefärbt. Detektiert wurden die CD14+(Monozyten), CD19+(B-Zellen) und schließlich die CD4+ und CD8+(T-Zellen).

#### Zielführung im Überblick:

##### **Ziel I:** Immunprofilierung der Spender

- *Hypothese 1: Die klinische Aktivität der Kolitis im Mausmodell ist abhängig vom Spender*

**Ziel II:** Monozyteninhibition als Therapieansatz

- *Hypothese 2.1: Der Monozyteninhibitor erniedrigt den klinischen Aktivitätsscore*
- *Hypothese 2.2: Der Monozyteninhibitor erniedrigt den makroskopischen Kolon Score*
- *Hypothese 2.3: Der Monozyteninhibitor erniedrigt den histologischen Score*

**Ziel III:** Die Wirkung des Monozyteninhibitors auf die in die Milz eingewanderten humanen Immunzellen

- *Hypothese 3.1: Der Monozyteninhibitor erniedrigt die Frequenz von Monozyten*
- *Hypothese 3.2: Der Monozyteninhibitor inhibiert die T-Zellaktivierung*
- *Hypothese 3.3: Der Monozyteninhibitor unterdrückt die Reifung von B-Zellen*

**Ziel IV:** PCA Analyse und Korrelation nach Pearson zur Bewertung der Effekte des Monozyteninhibitors im Tiermodell

*Hypothese 4.1: Die Testsubstanz ist wirksam im Mausmodell*

**Ziel V:** Wirkmechanismus der Testkomponente auf die Zytokinausschüttung und CRP

*Hypothese 5.1: Die Testkomponente erniedrigt die Zytokinausschüttung und CRP*

**Ziel VI:** Darstellung der Inflammation in der immunhistochemischen Färbung

- *Hypothese 6.1: Die Inflammation ist auch in humanen Biopsien von Monozyten bestimmt*
- *Hypothese 6.2: Die Wirkung der Testsubstanz wird in der Immunhistochemie deutlich*

**Ziel VII:** Monozyteninhibitor und Infliximab im Vergleich

*Hypothese 7.1: Die Wirkung von dem Monozyteninhibitor und Infliximab ist vergleichbar*

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1.1 Auswahl der Spender

Die Auswahl der passenden Spender erfolgte in der Sprechstunde von PD Dr. Florian Beigel. In Übereinstimmung mit dem Ethikvotum der LMU München Nummer 120-15 und nach Aufklärung sowie Unterzeichnung der Einverständniserklärung wurde den Patienten 60 ml Blut abgenommen. Für die Versuche wurden zwei Spender ausgewählt, die eine hohe Frequenz an M1 Monozyten und TH17-Zellen im Blut aufwiesen.

### 4.1.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden in einzeln belüfteten Käfigen unter optimierten Hygiene-Bedingungen in der Zentralen Versuchstierhaltung der Chirurgischen Klinik der LMU München in der Nussbaumstraße 20, 80336 München gehalten. Die Tierhaltung wird nach den Empfehlungen der FELASA regelmäßig kontrolliert und die Hygienebedingungen sind einer SPF-Haltung ähnlich. Die Tierversuche wurden unter dem Aktenzeichen ROB-55.2-2532.Vet\_02-19-106 bei der Regierung von Oberbayern genehmigt und unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

### 4.1.3 Isolierung humaner PBMC

Aus dem Spenderblut wurden humane PBMCs zur Rekonstitution der Versuchstiere isoliert. Dafür wurden 60ml Blut, das in 10 ml S-Monovetten (S-Monovette, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) abgenommen wurde, im Verhältnis 1:2 mit *Hank's balanced salt solution* (HBSS, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) gemischt und je 30ml auf LeucoSep Röhrchen (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. Diese wurden zuvor mit 15ml ROTI®Sep (ROTI®Sep 1077 human, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) befüllt. Um eine Interphase zu erzeugen wurden die LeucoSep Röhrchen 30 Minuten bei 400g ohne die Einstellung der Bremsfunktion zentrifugiert (Jodeleit, Milchram, et al., 2020).

Aufgrund unterschiedlicher Dichtegradienten trennten sich die Bestandteile des Blutes auf. Die entstandene Interphase wurde mit einer Pipette in ein 50ml Falcon (Nunc™ konische Zentrifugenröhrchen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) überführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 1:1 mit 30µl Tryptophan

(Trypan Blue solution 0,4% for microscopy, Sigma-Aldrich, Gillingham, Großbritannien) gemischt und unter dem Mikroskop in einer Neubauer Zählkammer (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) gezählt. Die Zellen wurden bei 1400g für 5 Minuten zentrifugiert und mit PBS (ROTI®CELL 10x PBS, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt bis die gewünschte Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen pro 100µl PBS erreicht wurde. Zur Berechnung des PBS Volumens wurde folgende Formel angewendet:

$$\frac{(((\text{Cells} * 4) * 2) * 10^4) * X}{Y}$$

X= Volumen der Interphase in ml

Y= Gewünschte Zellkonzentration ( $4 \times 10^6$  Zellen pro 100µl)

Die isolierten PBMCs wurden zur Rekonstitution der Mäuse und zur FACS Analyse (*fluorescence-activated cell sorting* (engl.), Durchflusszytometrie) verwendet. Für die FACS Analyse der PBMCs wurden 100µl Zellen auf 100µl FACS Mastermix pipettiert und die gefärbten Zellen mit dem FACS-Gerät (Attune NxT, Acoustic Focusing Cytometer, invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen.

#### 4.1.4 Rekonstitution

Die Tiere des Stammes NOD Scid IL2R $\gamma$  Chain<sup>null</sup> von Charles River wurden im Alter von 6 bis 8 Wochen rekonstituiert. Für die intravenöse Applikation in die Schwanzvene wurden die Tiere in einem *Restraîner* (Science Products, Hofheim, Deutschland) fixiert und die Vene zur Dilatation für maximal 1 Minute mit Infrarotlicht erwärmt. Appliziert wurden 100µl mit einer 1 ml Insulin-BD Mikro-fine 0,33 mm\*12,7 mm Spritze (BD bioscience, Heidelberg, Deutschland) in die *Venae dorsalis caudae* und *mediana* mit einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  PBMC.

## 4.2 Versuchsablauf

### 4.2.1 Versuchsgruppen

Für die beiden Versuche wurden insgesamt 48 weibliche und männliche NOD Scid IL2R $\gamma$  Chain<sup>null</sup> Mäuse im Alter von 6 bis 8 Wochen bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bestellt. Zum Versuchsbeginn wurden die Tiere in 4 Gruppen mit jeweils 6 Tieren eingeteilt, siehe Tabelle 3. Für die Rekonstitution wurden zwei unterschiedliche Spender gewählt. Alle Gruppen bekamen eine rektale Applikation von 50% Ethanol um die Kolitis Symptome auszulösen.

*Tabelle 3: Einteilung der Versuchsgruppen*

	0.5% Methylzellulose in H <sub>2</sub> O (MZ)	Testkomponente in 0.5% Methylzellulose /H <sub>2</sub> O (MZ+TS)	Isotyp Antikörper	Infliximab (Inflx)
Applikation	oral	oral	i.p.	i.p.
Ethanol Challenge	x	x	x	x
Spender A	6	6	6	6
Spender B	6	6	6	6

Die Rekonstitution erfolgte an Tag 0. An Tag 8 wurde den Tieren jeweils 10% Ethanol und 50% Ethanol an Tag 15 rektal appliziert. Die orale Applikation der Testkomponente und Methylzellulose erfolgte an den Tagen 7 bis 18. Infliximab und der Isotyp Antikörper wurden an Tag 7 und Tag 14 intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden ab Tag 7 bis zum Versuchsende täglich nach einem klinischen Score bewertet. Die Gewichtskontrolle erfolgte an den Tagen 8,10,12 sowie 14 bis 18, siehe Tabelle 4.

Tabelle 4: *Behandlungsprotokoll*

Tag/ Behand- lung	Rekonsti- tution	Sensiti- vierung/ Chal- lenge Ethanol	Behand- lung (i.p)	Behand- lung (oral)	Kontrolle Gewicht	Klinischer Score	Blutent- nahme
0	X						
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7			X	X		X	
8		X		X	X	X	
9				X		X	
10				X	X	X	
11				X		X	
12				X	X	X	
13				X		X	
14			X	X	X	X	
15		X		X	X	X	
16				X	X	X	
17				X	X	X	
18				X	X	X	
19							X

#### 4.2.2 *Medikamente*

Nach der Rekonstitution an Tag 0 wurde bei den Mäusen, durch zweimalige rektale Gabe von jeweils 150 µl Ethanol, *Kolitis* Symptome ausgelöst. An Tag 8 wurde den Tieren, unter Isoflurannarkose mit 4% Isofluran und einer Sauerstoffrate von 4l/min, rektal 10% Ethanol appliziert. Für die rektale Gabe wurde ein 1 mm Katzenkatheter (Henry Schein, Hamburg, Deutschland) verwendet, der zuvor mit 2% Xylocain-Gel (AstraZeneca, Wedel, Deutschland) zur Schmerzlinderung beschichtet worden war. An Tag 15 bekamen die Tiere 50% Ethanol unter Isoflurannarkose rektal appliziert. Nach den Ethanolapplikationen, 10 % Ethanol bei der Sensitiverung und 50% Ethanol bei der Challenge, wurden die Tiere bei einem Winkel von 30° für wenige Minuten hoch gelagert um ein frühzeitiges



Herauslaufen des Ethanols zu verhindern (Jodeleit, Milchram, et al., 2020).

In beiden Versuchen wurden die Tiere in 4 Gruppen mit jeweils 6 Tieren aufgeteilt. Alle Tiere wurden an Tag 0 rekonstituiert und rektal mit Ethanol zur Auslösung der *Kolitis* Symptome behandelt. Die erste Gruppe diente als negative Kontrollgruppe für die Testkomponente, um die Medikamentenwirkung auf die *Kolitis* im Vergleich zur Kontrolle beurteilen zu können. Die Tiere wurden mit 0.5% Methylzellulose (M0512-100g Methyl cellulose, viscosity 4,000cP, Sigma Aldrich, Gillingham, Großbritannien) behandelt, das zuvor in H<sub>2</sub>O gelöst worden war. Die orale Applikation von 100µl mit einer Sonde erfolgte an den Tagen 7 bis 18. Die zweite Gruppe wurde mit 10mg/kg Testkomponente gelöst in 0.5% Methylzellulose/H<sub>2</sub>O behandelt, deren Wirkmechanismus auf der Inhibition der Monozytenaktivierung beruht. Die Tiere bekamen an den Tagen 7 bis 18 eine orale Applikation von 100 µl mit der zu testenden Substanz. Die dritte Gruppe diente als Isotyp Kontrolle von Infliximab. Die Tiere bekamen an den Tagen 7 und 14 den Isotyp Antikörper mit einer Konzentration von 6 mg/kg in einer Menge von 100µl mit einer Spritze intraperitoneal appliziert. Die vierte Gruppe wurde mit Infliximab behandelt und diente zur Validierung des Tiermodells. Infliximab ist als Therapeutikum bei *Colitis ulcerosa* bereits hinreichend bekannt (Feuerstein et al., 2020). Die Tiere bekamen 100 µl an den Tagen 7 und 14 mit einer Konzentration von 6 mg/kg intraperitoneal injiziert. Für die orale Applikation wurde eine Sonde (Instech Laboratories™ Feeding tube, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet und für die intraperitoneale Applikation eine 1 ml Insulin-BD Mikrofine 0,33 mm\*12,7 mm Spritze (BD bioscience, Heidelberg, Deutschland).

#### 4.2.3 Klinischer Aktivitätsscore

Um den Schweregrad der *Kolitis* zu beurteilen wurden die Tiere täglich nach einem klinischen Aktivitätsscore beurteilt, siehe Tabelle 5. Insgesamt wurden 0-28 Punkte vergeben. Bei einem Einzelscore 4 mit über 20% Gewichtsverlust, starker Dehydratation, Apathie, Zyanose, gekrümmten Rücken, Elefantenzähne oder Prolaps sowie einem Einzelscore >4 oder einem Summenscore über 7 Punkte wurden die Tiere sofort euthanasiert und nicht in die Auswertung übernommen.

Tabelle 5: Kriterien zur Bewertung der klinischen Aktivität

Score mit „X“ führt zum sofortigen Versuchsabbruch. Bei einem Einzelscore von >4 oder einem Summenscore von >7 wurden die Tiere sofort euthanasiert.

Kriterium	Beurteilung	Punkte (max.28)
Körpergewicht	Kein	0
	5-10%	1
	10-15%	2
	15-20%	3
	>20%	X
Dehydratation	Hautfalte verstreicht langsam	3
	Hautfalte bleibt stehen	X
Kotkonsistenz	Geformt	0
	Breiig	1
	Flüssig	2
Fell	Normal	0
	Stumpf, gesträub	1
	Stumpf, gesträub (>2 Tage)	2
	Haarverlust (Barbering, Dalila Effekt)	2
Verhalten	Normal	0
	Ruhig	1
	Hyperkinese	2
	Somnolenz, Zittern	3
	Apathie	X
Atmung	Normal	0
	Leicht erhöht	1
	Erhöht (abdominelle Atmung)	2
	Deutlich reduziert	3
	Abdominell mit Zyanose	X
Körperhaltung	Normal	0
	Krämpfe, Lähmungen	X
	Gekrümmter Rücken	X
Verletzungen	Bisswunde	2
	Tiefe Bisswunde (Muskel)	3
	Bisswunden (keine Heilung)	X
	Elefantenzähne	X

#### 4.2.4 Makroskopischer Kolon Score

Bei der Sektion der Tiere wurde das Kolon entnommen, fotografiert und nach einem bereits etablierten Score (Jodeleit et al., 2019), siehe Tabelle 6. Bei der Bewertung konnten maximal 10 Punkte erreicht werden.

*Tabelle 6: Makroskopische Beurteilung des Kolons*

Kriterium	Beurteilung	Punkte (max.10)
Kotkonsistenz	Geformt	0
	Breiig	1
	Flüssig	2
Länge	>10cm	0
	8-10cm	1
	<8cm	2
Dilatation	Keine	0
	Geringgradig	1
	Mittelgradig	2
	Hochgradig	3
Einblutungen	Vorhanden	1
Nekrose	Vorhanden	1
Weitere Auffälligkeiten	z.B. Erosionen	1



### 4.3 Analysen

#### 4.3.1 Versuchsende

An Tag 19 wurde den Tieren 150µl Injektionsnarkose (Ketamin 120mg/kg, Xylazin 16mg/kg) gespritzt. Nach Überprüfung der chirurgischen Toleranz wurde den Mäusen maximal 1 ml Blut aus dem retrobulbären Venenplexus abgenommen und die Tiere anschließend mit zervikaler Dislokation getötet. Bei der Sektion wurden die Milz und das Kolon entnommen. Die Milz wurde über einen 70 µm Zellfilter (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gegeben und mit 5 ml PBS gespült. Bei einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 1400g entstand ein Zellpellet, dass in FACS-Puffer (500ml PBS, 10ml EDTA, 10ml FCS) resuspendiert wurde. Die Zellen wurden anschließend auf den Mastermix gegeben und mit einem FACS Gerät gemessen. Für die Histologie wurde von dem distalen Ende des Kolons 1cm in eine Histokassette (Rotilabo® Einbettkassetten, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben und für 24 Stunden in 4% Formaldehyd fixiert, bevor es am nächsten Tag in 70% Ethanol überführt wurde. Eine weitere Kolonprobe von 1 cm Länge wurde auf Trockeneis gelagert und für die anschließenden Luminex Analyse zur Detektion der Proteine bei -20 Grad tiefgefroren.

#### 4.3.2 Durchflusszytometrie

Die Antikörper für die folgenden FACS-Färbungen wurden gemäß der Antikörperliste, siehe Tabelle 22, bei Biolegend (San Diego, CA, USA) bestellt und unter Berücksichtigung der Herstellerangaben verwendet. Die Durchflusszytometrie wurde mit einem Attune NxT FACS Gerät von ThermoFisher (Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Fisher, Waltham, USA) durchgeführt und die Daten mit der FlowJo 10.1-Software (FlowJo LLC, OR, USA) ausgewertet. Die Zellen wurden gemäß der *Gating* Strategien im Anhang (Abbildung 31 bis 38) analysiert.

##### FACS-Färbung für Leukozyten der Milz

Für die Färbung wurden jeweils 100µl der Zellen auf 100µl Antikörper-Färbelösung pipettiert und bei 4°C im Kühlschrank für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation der Primärantikörper wurde bei ausgewählten *Stainings* ein Sekundärantikörper aufgebracht und für eine weitere halbe Stunde inkubiert.

##### FACS-Gating der Milz

Zur Bestimmung der Leukozytenpopulation wurden die Parameter FSC und SSC verwendet. Aus der Anzahl humaner CD45 (hCD45) an der Gesamtleukozytenzahl im Vergleich zu den murinen CD45 (mCD45) lassen sich Rückschlüsse über den Grad der Rekonstitution mit humanen PBMCs ziehen. Die Monozyten wurden zunächst anhand der Marker CD14<sup>+</sup> und CD16<sup>+</sup> in der Leukozytenpopulation definiert, vergleiche Tabelle 7. Die CD14<sup>+</sup> Zellen wurden auf die Expression von CD64<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup> und CD206<sup>+</sup> untersucht. Der Marker CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> markiert die M2 Monozyten und die Population CD14<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup> die M1 Monozyten. Die Frequenz an T-Zellen wurden anhand des CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Markers in der Gesamtleukozytenanzahl untersucht. Das Oberflächenantigen CD4<sup>+</sup> wird von T-Helfer Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert, CD8<sup>+</sup> von zytotoxischen T-Zellen. Aktivierte T-Helferzellen wurden anhand der Marker CD4<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup> identifiziert. Mithilfe des CD19-Markers, der in der Entwicklung der B-Zellen schon sehr früh exprimiert wird, und des IgD-Markers wurden die B-Lymphozyten aus der Population der Leukozyten identifiziert. Anhand der Oberflächen Antigene CD23 und CD 27 konnte zwischen naiven B-Zellen, CD23<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup> Zellen, und frühen *memory* B-Zellen, CD23<sup>-</sup>/CD27<sup>+</sup> Zellen, unterschieden werden. Der Marker CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> markiert die Plasmazellen.

*Tabelle 7: Zellen gemessen in der Durchflusszytometrie*

Humane Zellen sind aufgeführt. Murine Zellen sind mit einem „m“ gekennzeichnet.

Marker	Zellen
CD45 <sup>+</sup>	Leukozyten
mCD45 <sup>+</sup>	Murine Leukozyten
CD14 <sup>+</sup>	Monozyten
CD14 <sup>+</sup> CD64 <sup>+</sup>	M1 Monozyten
CD14 <sup>+</sup> CD163 <sup>+</sup> CD206 <sup>+</sup>	M2 Monozyten
CD4 <sup>+</sup>	T-Zellen
CD4 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup>	B-Zelle mit $\alpha E:\beta 7$ Integrin
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	Regulatorische T-Zelle
CD4 <sup>+</sup> CD134 <sup>+</sup>	B-Zelle mit OX40 Rezeptor
CD19 <sup>+</sup>	B-Zellen
CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	Plasmazellen
CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>	<i>Affinity matured</i> B-Zelle
CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>	Naive B-Zelle

### 4.3.3 Histologie

Bei der Präparation wurde 1cm des distalen Kolons entnommen und für 24 Stunden in 4% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die histologischen Proben in 70% Ethanol überführt. Im Histomaten (Leica TP1020 Automatische Gewebefiltration, Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) durchliefen die Proben zunächst eine aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung, gefolgt von Xylol (Xylol Isomere, >98%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) als Intermedium, das im letzten Schritt durch heißes Paraffinwachs (Tissue-Tek® Paraffinwachse, Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) ersetzt wurde. Aus den Gewebeproben wurden an einer Ausgießstation (Tissue-Tek®TEC™6, Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) Paraffinblöcke gegossen. Mithilfe eines Rotationsmikrotoms (Microm HM 355 S, Thermofisher, Waltham, MA, USA) wurden von den Blöcken 3µm dicke Schnitte angefertigt, die in ein 40°C warmes Wasserbad (Medax Nagel, Kiel, Deutschland) überführt und auf Superfrost Objektträger (Thermofisher, Waltham, MA, USA) aufgezogen wurden.

#### Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung wurde 1863 von Wilhelm von Waldeyer entwickelt und eignet sich zur Darstellung komplexer histopathologischer Veränderungen (Alturkistani et al., 2015; Shostak, 2013). Die Gewebeschnitte wurden für 2x5 Minuten in Xylol (Roti®-Histol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) deparaffiniert und anschließend für jeweils 2x5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe mit absolutem, 96% und 70% Ethanol (Ethanol vergällt >99,8%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) rehydriert. Es folgte ein Zwischenschritt für 5 Minuten in destilliertem Wasser. Für die Färbung wurde, nach einer kurzen Spülung in Leitungswasser, eine 4-minütige basische Kernfärbung in Hämalan (Hämalanlösung sauer nach Mayer, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) angewandt. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten unter laufenden Leitungswasser gebläut. Nach einem kurzen Spülschritt mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit dem sauren Zytoplasmafarbstoff Eosin (Eosin B, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 4 Minuten. Abschließend folgte die Dehydrierung der Schnitte für wenige Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 80%, 96% und 100% Ethanol, und die Fixierung für 2x5 Minuten in Xylol. Die Schnitte wurden danach mit 24x60mm Deckgläschen (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

### Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Die Differenzierungsfärbung von Muskeln, Bindegewebe und Plasma beruht auf einem modifiziertem Protokoll nach Goldner (Goldner, 1938). Die verwendeten Lösungen stammen aus einem Färbekit (Färbekit: Masson Goldner Trichrom, Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland) und wurden gemäß Herstellerangaben verwendet. Im ersten Schritt der Färbung durchliefen die Schnitte zur Deparaffinierung 2x5 Minuten Xylol (Roti®-Histol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), gefolgt von jeweils 2 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 96%, 80%, 70%, und 60% Ethanol (Ethanol vergällt >99,8%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zum Wässern. Nach einer Spülung von 2 Minuten in destilliertem Wasser, wurden die Kerne der Gewebeschnitte mit Weigerts Eisenhämatoxylin, in einem Mischverhältnis von 1:1 von Stammlösung A mit Stammlösung B für 15 Minuten angefärbt. Nach einem kurzen Spülschritt in destilliertem Wasser, wurden die Schnitte für 8 Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Für die Färbung des Zellplasmas wurde Säurefuchsin-Ponceau-Azophloxin für 4 Minuten verwendet. Zum Differenzieren wurden die Gewebeschnitte anschließend für 30 Sekunden in 1% Essigsäure gegeben. Es folgte ein Schritt zum Beizen und Färben mit Phosphormolybdänsäure-Orange G für 30 Minuten. Nach einem Differenzierungsschritt in 1% Essigsäure wurde das Gewebe für 12 Minuten mit Goldner-Lichtgrün gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit 1% Essigsäure für 2 Minuten, gefolgt von Leitungswasser gespült. Zum Entwässern wurden die Schnitte 2x2 Minuten in 96% Ethanol, 2 Minuten in Isopropanol und 2x5 Minuten in Xylol gegeben. Zum Schluss wurden die Schnitte mit 24x60mm Deckgläschen (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bedeckt.

### Periodic acid-Schiff (PAS)-Färbung

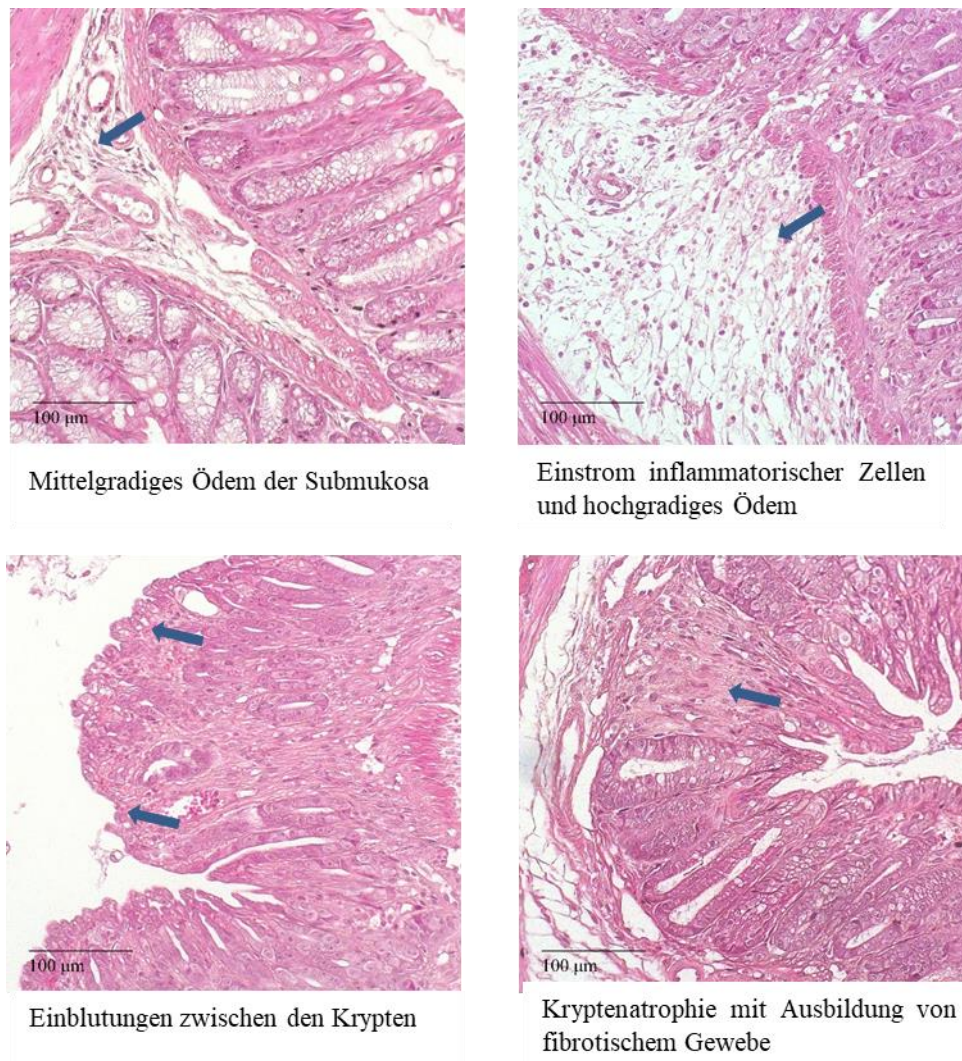
*Mucin* wird von den Becherzellen sekretiert und stellt einen wichtigen Teil des Immunsystems des Kolons dar. Pathologische Veränderungen dieser Zellen können mittels PAS-Färbung, basierend auf der Anfärbung des *Muzins*, visualisiert werden (Yasuda-Onozawa et al., 2017). Die Färbung wurde mit einem Färbekit (Färbekit: PAS-Reaktion, Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst erfolgte die Deparaffinierung mit 2x5 Minuten Xylol (Roti®-Histol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), gefolgt von jeweils 2 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 96%, 80%, 70%, und 60% Ethanol (Ethanol vergällt >99,8%, Carl Roth, Karlsruhe,



Deutschland) zum Wässern. Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 10 Minuten mit 1% Perjodsäure oxidiert. Es folgten vier Waschschritten mit anschließender Färbung der Schnitte für 25 Minuten in Schiff'schem Reagenz. Nach zwei weiteren Waschschritten erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxillin für 5 Minuten, gefolgt von Leitungswasser gespült. Zum Entwässern wurden die Schnitte 2x2 Minuten in 96% Ethanol, 2 Minuten in Isopropanol und 2x5 Minuten in Xylol gegeben und schließlich mit 24x60mm Deckgläschen (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bedeckt.

#### Histologischer Score

Für die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) und die Masson-Goldner-Trichrom (MGT) wurden die Proben in 3µm Dicke geschnitten und gefärbt. Die gefärbten HE-Schnitte wurden nach einem modifizierten Score bewertet (Jodeleit et al., 2020), siehe Abbildung 4.



*Abbildung 4: Beispielaufnahmen zu den Befunden des histologischen Scores aus Tabelle 8*

Die pathologischen Veränderungen sind mit breiten Pfeilen markiert, die Befunde stehen unter den Aufnahmen.

Insgesamt wurde ein Punktesystem von 0-20 Punkten vergeben, siehe Tabelle 8. Die Bilder wurden an einem Axiovert 40 CFL Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer Axiocam 105 Farbkamera (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Die verwendete Software war die Zen 2.3 (blaue Edition, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Der Kontrast der Bilder wurde im Photoshop CC 2017 bearbeitet.

Tabelle 8: Kriterien des histologischen Scores

Kriterium	Ausprägung	Punkte (max.20)
Erosionen des Epithels	Fokal	1
	Multifokal	2
	tiefgreifend	3
Infiltration inflammatorischer Zellen	Wenige	1
	Kontinuierlich	2
	Hochgradig	3
	Infiltration bis Tunica muscularis	4
Ödeme	Geringgradig	1
	Mittelgradig	2
	hochgradig	3
Becherzellverlust	Geringgradig	1
	Mittelgradig	2
	hochgradig	3
Fibrose	Fokal	1
	Multifokal mit Kryptenatrophie	2
	generalisiert	3
Einblutungen	vorhanden	1
Kryptenelongation	vorhanden	1

#### 4.3.4 Immunhistochemische Färbung (IHC)

Bei der IHC-Färbung wurden Monozyten, B-Zellen und T-Zellen detektiert, siehe Abbildung 5. Dafür wurden aus jeder Behandlungsgruppe repräsentative Schnitte ausgesucht und angefärbt. Es handelt sich um eine indirekte Immunhistochemische Färbung, bei der fluoreszierende Sekundärantikörper verwendet wurden. Alle Antikörper wurden von Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) bezogen und gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Fotos wurden mit einem Routinemikroskop Axioskop (Carl, Zeiss. Oberkochen, Deutschland) mit einem Mikroskop Axio Imager.D2 (Carl, Zeiss. Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Im ersten Schritt wurden die 3µm Schnitte 2x3 Minuten in Xylol (Roti®-Histol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 3x Minuten in Xylol und absolutem Ethanol (Verhältnis 1:1) deparaffiniert. Es folgte die Rehydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 3 Minuten, bestehend aus 100%, 95%, 70% und 50% Ethanol. Im zweiten Schritt wurden die Antigenbindungsstellen, die durch Methylenbrücken verdeckt sind, durch Hitze freigelegt. Dazu wurden die Schnitte in eine Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung, im Verhältnis von 0,37g EDTA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf 1000ml destilliertem Wasser,

mit einem pH von 8.0 gegeben und für 10 Minuten in einer Mikrowelle mit 850W gekocht. Nachdem die Schnitte 10 Minuten in der EDTA-Lösung abgekühlt waren, wurden sie für weitere 10 Minuten unter fließendes kaltes Wasser gegeben. Im dritten Schritt wurden die Schnitte 2x5 Minuten in *Tris-buffered saline* (10x TBS, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen und in TBS mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma Aldrich, Gillingham, Großbritannien) für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden die Primärantikörper auf die Schnitte pipettiert. Die Antikörper CD4, CD14, CD19, CD8 wurden 1:100 in TBS mit 1% BSA verdünnt und in Eppendorfgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gegeben. Pro Schnitt wurden 100µl der Antikörper-Lösung aufgetragen und bei 4°C im Kühlschrank über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag folgte ein Waschschrift für 2x5 Minuten in TBS. Um das Hintergrund Signal zu reduzieren, wurden die Schnitte 15 Minuten in TBS mit 0,3% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma Aldrich, Gillingham, Großbritannien) inkubiert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden 1:400 in TBS mit 1% BSA verdünnt und auf die Schnitte pipettiert. Dieser Schritt erfolgte im Dunkeln um ein *Photobleaching* der Fluoreszenz-Antikörper zu vermeiden. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden die Schnitte 3x5 Minuten in TBS gewaschen und mit nach Zugabe von *Mounting Medium* (Thermofisher, Waltham, MA, USA) mit 24x60mm Deckgläschen eingedeckt. Für die Biopsien wurde dasselbe Verfahren angewendet. Zellkerne sind mit einer DAPI Färbung blau angefärbt. Aufnahmen mit einem Routinemikroskop Axioskop mit einem Mikroskop Axio Imager.D2 aufgenommen. Die Bildbearbeitung wurde mit CCPhotoshop 2017 durchgeführt.

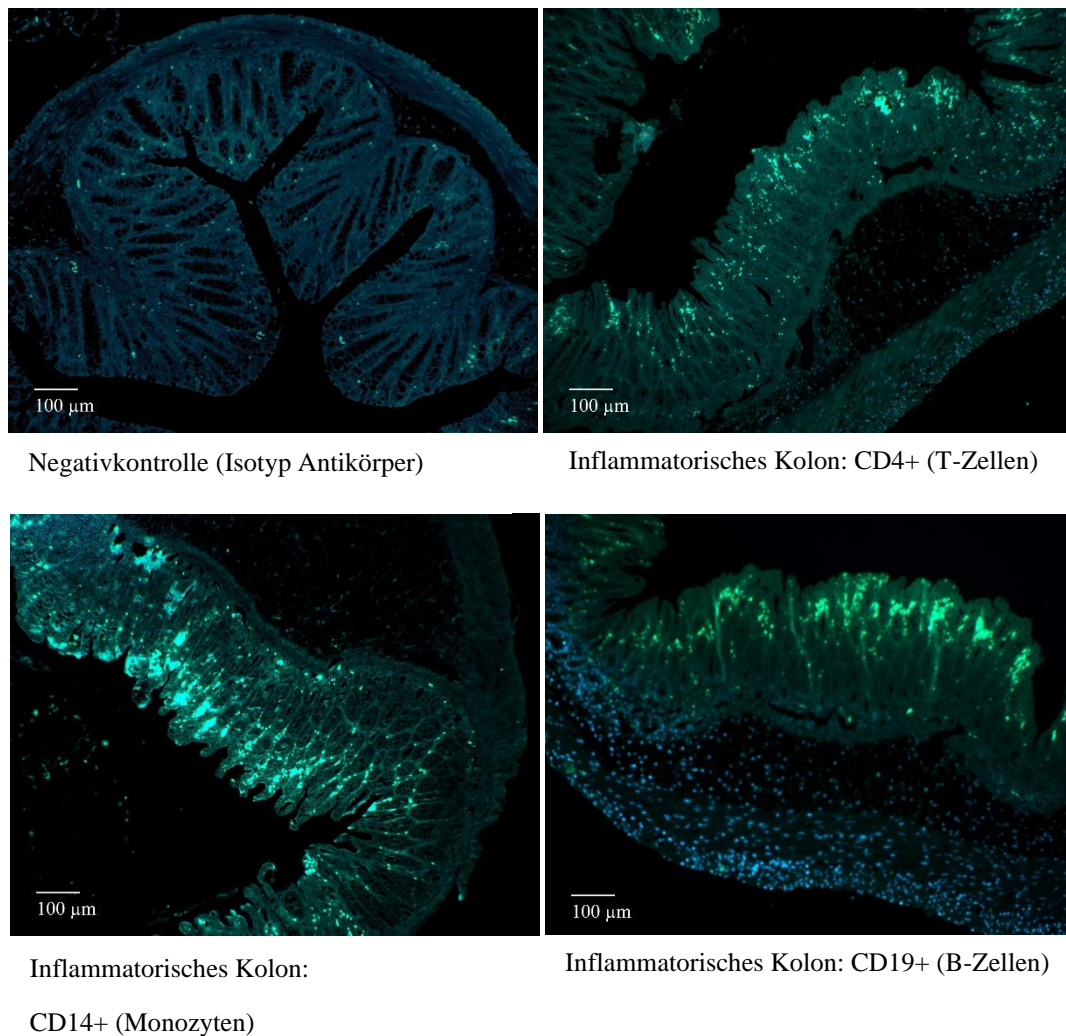


Abbildung 5: Beispielaufnahmen einer IHC-Färbung

Vergleich zwischen einer Negativkontrolle (links oben) und inflammatorischen Kolonaufnahmen. Auffällig sind die hochgradigen Ödeme und der erhöhte Einstrom von T-Zellen, Monozyten und B-Zellen bis zur luminalen Seite der Krypten.

#### 4.3.5 Detektion von Zytokinen im Kolon

Bei der Sektion wurde 1cm des distalen Kolons entnommen und mit PBS gespült. Für die Lyse der Zellen wurde ein bereits etabliertes Protokoll (Jodeleit et al., 2019) verwendet: Die Darmproben wurden mit jeweils 500µl einer Protease Inhibitor Lösung (cOmplete, Roche, Penzberg, Deutschland) und einer 5mm Metallkugel (Qiagen, Hilden, Deutschland) für 5 Minuten bei 3000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bei -80°C tiefgefroren.

Die Zytokine im Überstand wurden mithilfe von Luminex ProcartaPlex Immunoassays (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) gemessen, vergleiche Tabelle 9. Es wurde das *ProcartaPlex Mouse Basic Kit* (Cat#EPX010-20440-901;

RRID:AB\_2575761) mit *Beads* für CRP, MCP3 und TGF $\beta$  verwendet. Zur Detektion der humanen Zytokine wurde das *ProcartaPlex Human High Sensitivity Basic Kit* (Cat#EPXS010-10420-901; RRID:AB\_2576181) mit *Beads* für humanes IFN gamma, IL17, IL12 und murines IL6 angewendet.

Tabelle 9: *Luminex Beads mit Katalognummer und RRID*

Beads:	Cat#RRID#
ProcartaPlex Mouse CRP Simplex	Cat#EXP01A-26045-901; RRID:AB_2575963
ProcartaPlex Mouse MCP-3 (CCL7) Simplex	Cat# EPX01A-26006-901; RRID:AB_2575933
ProcartaPlex Mouse TGF-beta 1 Simplex	Cat#EPX01A-20608-901; RRID:AB_2575921
ProcartaPlex Human High Sensitivity IFN	Cat#EPXS010-10228-901; RRID:AB_2576179
ProcartaPlex Human High Sensitivity IL-17A	Cat#EPXS010-12017-901; RRID:AB_2576182
ProcartaPlex Human High Sensitivity IL-12p70	Cat#EPXS010-10238-901; RRID:AB_2576180
ProcartaPlex Mouse High Sensitivity IL-6	Cat#EPXS010-20603-901; RRID:AB_2576185

#### 4.3.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit „R-Studio“, eine Benutzeroberfläche des R-Programmes (<https://cran.rstudio.com/>). Die nachfolgenden Pakete wurden für die Analyse der Daten und das Erstellen der Grafiken geladen: readxl, ggplot2, dabeistr, magittr, tibble, RColorBrewer, factoextra, devtools, ellipsis, ggfortify, psych, stats und Hmisc. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde ein t-Test angewandt. Gruppenvergleiche normalverteilter Datenmengen wurden mit der einfaktoriellen ANOVA und *Tukey HSD-Test* ausgewertet. Nicht normalverteilte Gruppen wurden mit dem *Kruskal-Wallis Test* und *post-hoc* mit dem *Dunn-Bonferroni-Test* bewertet. Festgelegte Signifikanzen:

*	p=<0,05 – 0,01
**	p=0,01 – 0,001
***	p=<0,001

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Immunprofil und klinischer Score der Spender

Der Schweregrad der *Colitis ulcerosa* Erkrankung wurde nach dem klinischen Aktivitätsindex von Walmsley (Walmsley, Ayres, Pounder, & Allan, 1998) beurteilt. Folgende Kriterien wurden dabei mit einem Punktesystem von maximal 19 Punkten berücksichtigt: Häufigkeit und Dringlichkeit des Stuhlgangs, Ausscheidung von Blut, Allgemeinbefinden und Extraintestinale Manifestationen.

Von den Spendern wurde zusätzlich ein immunologisches Profil erstellt (Jodeleit et al., 2019): 40 UC Spender und 16 gesunde Spender wurden zur Erstellung des Immunprofiles hinsichtlich Subtypen der CD4+ und CD8+ T-Zellen, B-Zellen und CD14+ Monozyten untersucht. Für die Versuche wurden Spender ausgewählt, die eine erhöhte Anzahl an Monozyten aufwiesen und somit dem Monozyteninhibitor einen optimalen Angriffspunkt lieferten. Beide Spender, A und B, befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in der Phase der Wundheilung einhergehend mit einer erhöhten Anzahl von M1 Monozyten (CD14+CD64+) und TH-17 Zellen, siehe Tabelle 10.

*Tabelle 10: Immunologische und klinische Auswertung der Spender zur Identifizierung eines optimalen Profils für den Einsatz des Monozyteninhibitors*

Spender	A	B
SCCAI	5	11
Medikamente	Cyclosporin	Entivio Xeljanz, Mesalazin
Verlauf	Chronisch-rezidivierend	Chronisch-rezidivierend
CD64+[%CD14+]	76,7	93,7
TH17+[%CD4+]	50,8	91,9

Eine erhöhte Frequenz an M1 Monozyten (CD14+CD64+) und CD14+CD1a+ konnte bei beiden Spendern, im Vergleich zu der gesunden Kontrolle (N=8), nachgewiesen werden, siehe Abbildung 6. Die CD14+CD1a+ Population war bei Spender B erhöht im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Die Frequenz der CD14+CD252+ Zellen war bei Spender A und Spender B höher im Vergleich zur Population der Gesunden. Die Spender wiesen eine Aktivierung des TH17/Monozyten getriebenen Wundheilungsprozesses auf. Verglichen mit der gesunden Kontrolle wurde eine erhöhte Frequenz an TH22 Zellen bei Spender B



gemessen. Die TH17+ Population war bei Spender A gering und bei Spender B deutlich erhöht im Vergleich zu den Gesunden. Die Frequenz an TH17+TH1+ lag bei beiden Spendern über dem Mittelwert der gesunden Kontrollgruppe.

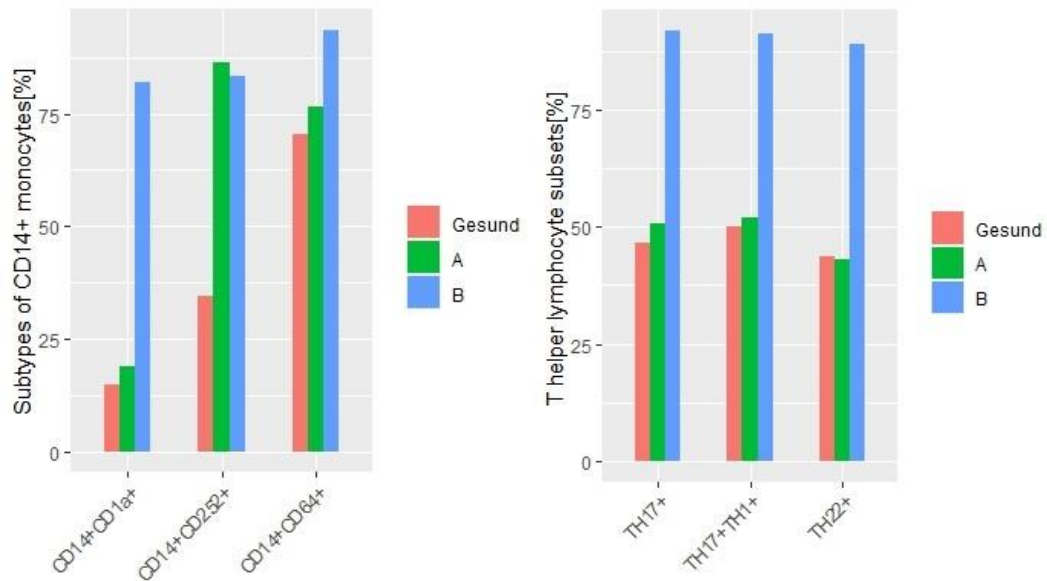


Abbildung 6: PBMC Auswertung der Spender

Subtypen der CD14+ Monozyten [%] und Subtypen der T-Helfer Zellen [%] als Säulendiagramm. Verglichen wurden drei Gruppen: der Spender A, der Spender B und eine gesunde Kontrollgruppe (N=8). Mittelwerte und Standardabweichung sind im Anhang verfügbar.



## 5.2 Effekte des Monozyteninhibitors im Mausmodell

### 5.2.1 Beurteilung der klinischen Wirksamkeit

Die klinische Wirksamkeit der Testsubstanz wurde im NSG-UC Mausmodell in zwei Versuchen mit zwei verschiedenen Spendern getestet und mit Infliximab verglichen. Infliximab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen TNF $\alpha$  gerichtet ist und zur Standardtherapie von UC gehört. Für die Versuche wurden PBMCs von UC Spendern isoliert und die Mäuse mit  $4 \times 10^6$  Zellen rekonstituiert. Entsprechend dem Behandlungsprotokoll, beschrieben in Material und Methoden, wurden die Tiere in 4 Gruppen aufgeteilt und behandelt. In allen Gruppen wurden *Kolitis* Symptome an den Tagen 8 und 15 ausgelöst. In den ersten zwei Gruppen wurde die Wirksamkeit der Testsubstanz mit der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. An den Tagen 7 bis 18 nach Rekonstitution wurde die Kontrollgruppe (MZ, N=12) oral mit 100 $\mu$ l 0.5%iger Methylzellulose gelöst in H<sub>2</sub>O behandelt, während die zweite Gruppe (MZ+TS, N=12) 100  $\mu$ l von der Testkomponente, gelöst in 0.5% Methylzellulose und H<sub>2</sub>O, oral appliziert bekam. Die Wirkung der Testsubstanz sollte mit der von Infliximab verglichen werden. Daher wurden in den Gruppen drei und vier die Wirkung von Infliximab im Vergleich zur Isotypkontrolle getestet. In Gruppe drei (Isotyp, N=12) erhielten die Mäuse sieben und vierzehn Tage nach der Rekonstitution 100 $\mu$ l des 6 mg/kg Isotyp Antikörpers intraperitoneal gespritzt, wohingegen die vierte Gruppe (Inflx., N=10) intraperitoneal mit 100 $\mu$ l Infliximab in einer Konzentration von 6mg/kg behandelt wurde. Die Wirksamkeit der Therapeutika wurde mit der jeweiligen Kontrollgruppe evaluiert. Die Wirkung der Testkomponente und Inflx. wurde anhand des klinischen Aktivitätsscores, des histologischen Scores und des makroskopischen Kolon Scores, wie in Material und Methoden beschrieben, beurteilt.

Nach der Challenge mit 50% Ethanol an Tag 15 zeigten einige Tiere aus der MZ-Gruppe breiigen Kotabsatz, der zu Gewichtsverlust führte und sich in einem deutlichen Anstieg des klinischen Scores ( $1,58 \pm 2,23$ ) manifestierte, vergleiche Abbildung 7. Tiere, denen die Testkomponente appliziert wurde, zeigten nach der zweiten Ethanol *Challenge* eine geringe Reduzierung des Körpergewichtes von der sie sich schnell erholten und erreichten einen Wert von ( $0,75 \pm 1,06$ ). Der klinische Aktivitätsscore blieb in der Isotyp-Gruppe ( $0,25 \pm 0,87$ ) und der Inflx.-Gruppe gering ( $0,5 \pm 0,71$ ). Die Ergebnisse sind als *Cumming Plot* in Abbildung 7 dargestellt. Im oberen Feld ist der klinische Score als Schwarmplot aufgetragen,

Standardabweichungen sind als vertikale Linien präsentiert, zwischen denen der Mittelwert liegt. Im unteren Feld sind auf einer separaten Nulllinie die Effektgröße (Mittelwertdifferenz) als Punkt, der Standardfehler als schattierte Kurve und das 95% Konfidenzintervall als Fehlerbalken nach dem *Bootstrapping* Verfahren markiert. Im paarweisen Vergleich wurden die Effekte von der Testkomponente (MZ+TS) auf die Kontrollgruppe (MZ), sowie die Wirkung von Infliximab auf die Isotypkontrolle (Isotyp) bewertet. Im Schwarmplot der MZ-Gruppe wird die Ausbreitung und der Anstieg der klinischen Scores verdeutlicht, im Vergleich zur Gruppe der Testkomponente, deren Werte dicht zusammen clustern. Der inverse Wert der Effektstärke untermauert die Annahme, dass der Monozyteninhibitor deutliche Effekte auf den klinischen Score erzielte. Die klinischen Scores aus der Isotyp Gruppe und der Infliximab Gruppe zeigten keinen Unterschied, veranschaulicht in den Schwarmplots mit geringer Varianz der Werte und einer Effektstärke die im positiven Wertebereich liegt.

Nach dem Versuchsende wurde den Tieren bei der Sektion das Kolon entnommen und makroskopisch beurteilt. Das Kolon der MZ-Gruppe zeigte ungeformten bis teilweise flüssigen Kot, einer mittel- bis hochgradigen Dilatation und Einblutungen in die Darmschleimhaut und verkürzte Kolonlängen, siehe. Im Vergleich dazu zeigt das Kolon der MZ+TS Gruppe geringere pathologische Veränderungen. Die Veränderungen wurden anhand eines Kolon Scores, siehe Tabelle 6, eingestuft. Die MZ Gruppe wies einen Score von  $(3,5 \pm 1,93)$  und die MZ+TS einen Score von  $(2,58 \pm 1)$  auf, der Unterschied war nicht signifikant. Die Darmabschnitte der Isotyp-Antikörper Gruppe mit ungeformter Kotkonsistenz, teilweisen Einblutungen und mittel-bis hochgradiger Dilatation wiesen einen erhöhten makroskopischen Kolon Score auf  $(4,42 \pm 1,38)$ , im Vergleich zu Tieren aus der Infliximab Gruppe mit einer mittelgradigen Dilatation sowie in einigen Fällen ungeformten Kot  $(3,3 \pm 1,06)$ , ersichtlich in Abbildung 7. Der Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant.

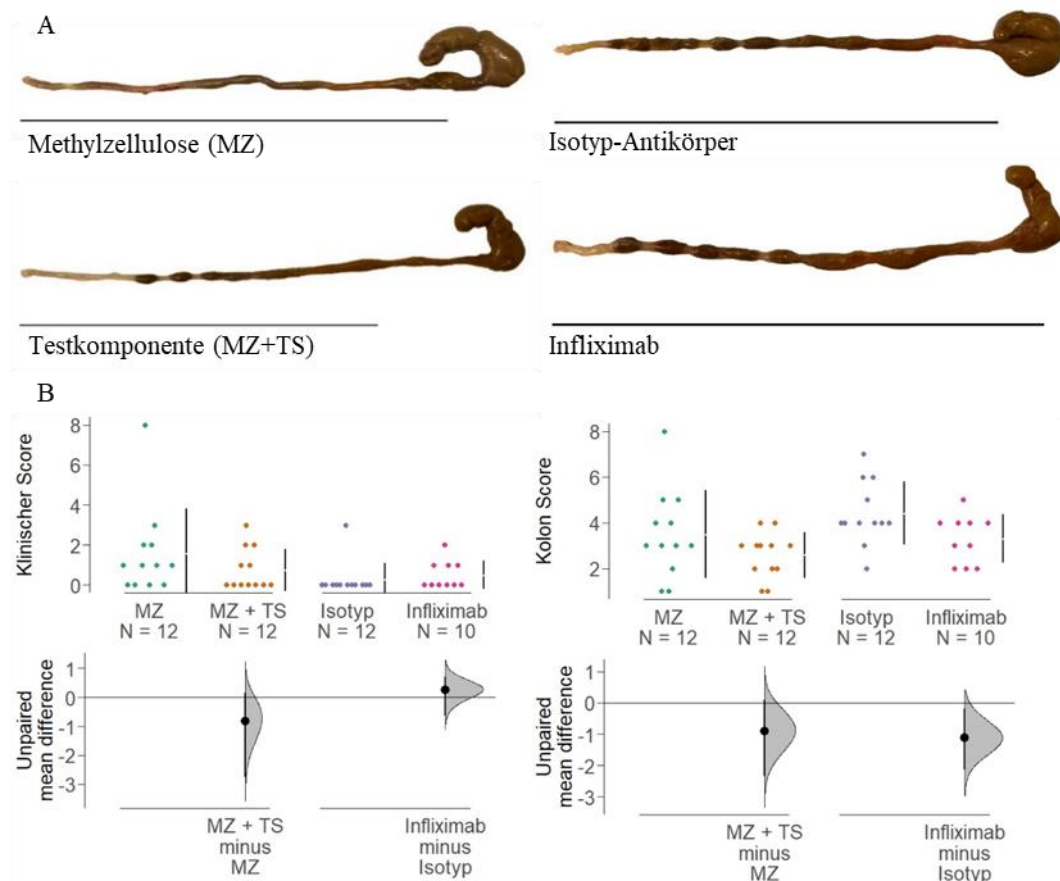


Abbildung 7: A: Repräsentative Foto des Kolons zur Beurteilung des makroskopischen Kolon Scores. B: Klinischer Score und Kolon Score als Cumming Plots

**A:** Ein repräsentatives Kolonbild aus jeder Gruppe: links oben: Kontrollgruppe behandelt mit 0.5% Methylzellulose in H<sub>2</sub>O (MZ), links unten: Gruppe mit 10mg/kg Testkomponente gelöst in 0.5% Methylzellulose in H<sub>2</sub>O (MZ+TS), rechts oben: Kontrollgruppe behandelt mit 6mg/kg Isotyp Antikörper (Isotyp), rechts unten: 6mg/kg Infliximab **B:** Der klinische Score und der Kolon Score sind als Cumming Plots dargestellt. Paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen: MZ-Gruppe (N=12) verglichen mit der MZ+TS Gruppe (N=12), und eine Isotyp Gruppe (N=12) verglichen mit der Infliximab Gruppe (N=10). Der obere Anteil der Abbildung zeigt die Daten als Schwarmplot. Standardabweichung sind als vertikale Linien, mit dazwischen liegenden Mittelwert angezeigt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Nulllinie, abhängig vom Mittelwert der Kontrolle. Die Punkte zeigen die Effektstärke (Mittelwertdifferenz) an. Fehlerbalken stellen das 95% Konfidenzintervall und schattierte Flächen den Standardfehler dar. Höhere Ausschläge weisen auf einen geringen Standardfehler hin.

Für die histologische Beurteilung des Kolons wurden drei Färbungen angefertigt, vergleiche Abbildung 8 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE), Masson-Goldner-Trichrom Färbung (MGT) und eine *periodic acid Schiff* Reaktion Färbung (PAS). Zur Beurteilung wurde ein histologischer Score mit maximal 20 Punkten

verwendet, der folgenden Kriterien berücksichtigt: Epithel Erosionen, Einfluss inflammatorischer Zellen, Ödeme, Becherzellverlust, Fibrose, Einblutungen, *Tufting* und Kryptenelongation. Die MZ Gruppe zeigte mittelgradigen Einstrom inflammatorischer Zellen, mittel- bis hochgradigen Becherzellverlust und Fibrose, mittelgradige Ödeme sowie Einblutungen auf der luminalen Seite der Krypten, siehe Abbildung 8. Dies resultierte in einem deutlich erhöhten histologischen Score ( $7,42 \pm 5,02$ ), dargestellt in Abbildung 9. Die MZ+TS Gruppe wies im histologischen Bild eine niedrige Anzahl von Entzündungszellen, geringe fibrotische Veränderung der Krypten und intakte Becherzellen auf. Die Applikation der Testkomponente resultierte in einem geringen histologischen Score ( $4,25 \pm 2,22$ ). Der Unterschied zur MZ-Gruppe war nicht signifikant. Eine geringe bis mittelgradige Fibrose, mittelgradige Ödeme und ein geringer Becherzellverlust prägt das histologische Bild der Isotyp Gruppe ( $5,17 \pm 1,59$ ). Die histologischen Schnitte der Infliximab Gruppe zeigen weitgehend intakte Becherzellen, ersichtlich in Abbildung 8. Die pathologischen Veränderungen sind auf eine geringe Fibrose sowie den Einstrom weniger inflammatorischer Zellen begrenzt. Dies führt zu einem niedrigen histologischen Score ( $3,1 \pm 1,97$ ), siehe Abbildung 9. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.



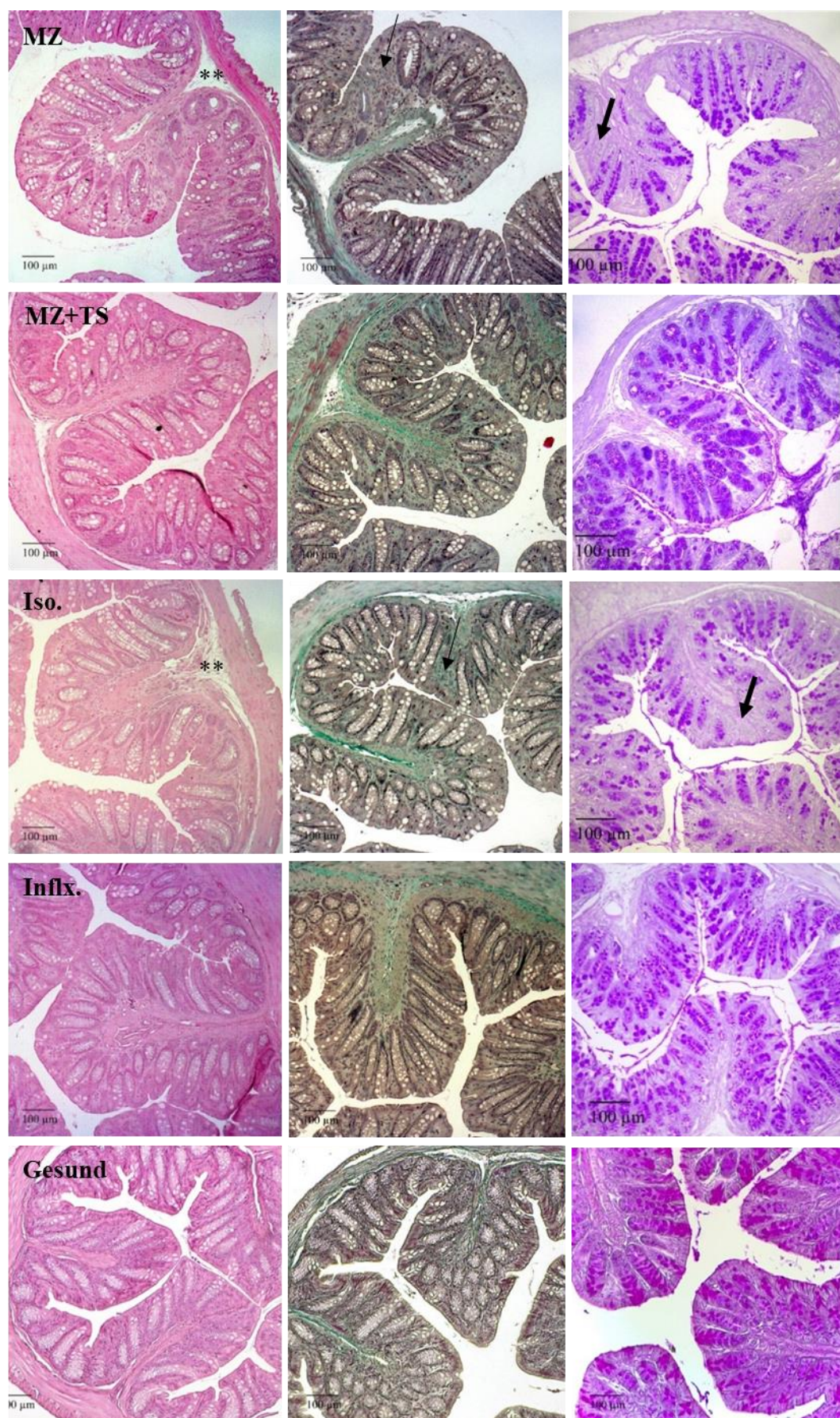


Abbildung 8: Repräsentative Bilder der histologischen Schnitte

Repräsentative Bilder der histolgischen Schnitte des distalen Part des Kolons. Färbungen: Links (HE), Mitte: (MGT), Rechts (PAS). MZ: 0.5% Methylzellulose in H<sub>2</sub>O; MZ+TS: 10mg/kg Testkomponente gelöst in 0.5%Methylzellulose und H<sub>2</sub>O; Iso.: 6mg/kg Isotyp Antikörper; Influx.:6 mg/kg Infliximab; Gesund: gesunde Kontrolle (unchallenged control). Sternchen markieren inflammatorische Zellen und Ödeme, schmale Pfeile kennzeichnen fibrotische Veränderungen und breite Pfeile weisen auf Becherzellverlust hin.

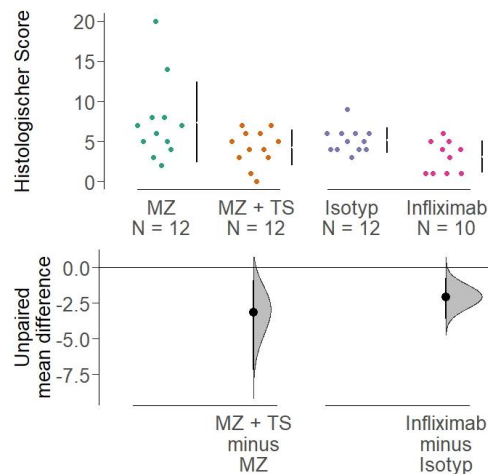


Abbildung 9: Histologischer Score als Cumming Plot

Der histologische Score ist als Cumming Plot dargestellt. Paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen: MZ-Gruppe (N=12) verglichen mit der MZ+TS Gruppe (N=12), und eine Isotyp Gruppe (N=12) verglichen mit der Infliximab Gruppe (N=10). Der obere Anteil der Abbildung zeigt die Daten als Streudiplot. Standardabweichungen sind als vertikale Linien, mit dazwischen liegenden Mittelwerten angezeigt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Nulllinie, abhängig vom Mittelwert der Kontrolle. Die Punkte zeigen die Effektstärke (Mittelwertdifferenz) an. Die Fehlerbalken stellen das 95% Konfidenzintervall und die schattierten Flächen den Standardfehler dar.

### 5.2.2 Wirkmechanismus auf die Immunzellen in der Milz

Die Wirkung der Testkomponente auf die immunologischen Vorgänge in der Maus wurde anhand von Leukozyten in der Milz beurteilt insbesondere Monozyten, T-Zellen und B-Zellen, die mittels Durchflusszytometrie gemessen wurden.

#### Anteil humaner Leukozyten im murinen Immunsystem

Die humanen Leukozyten wurden als CD45+ Population identifiziert und von den murinen CD45+ Zellen unterschieden. Einen signifikant erhöhten Anteil an humanen CD45+ Zellen im Vergleich zur Isotyp Antikörper Gruppe wiesen Tiere auf, die mit Methylcellulose oder der Testkomponente behandelt wurden (MZ:  $10,99 \pm 1,58$  hCD45+[%Leukozyten], p-Wert=0,010; MZ+TS:  $11,8 \pm 2,95$  hCD45+[%Leukozyten], p-Wert=0,002), vergleiche Abbildung 10.

### Wirkung auf Monozyten und Makrophagen

Der Wirkmechanismus der Testsubstanz beruht auf der Inhibition der Monozyten. Zur Beurteilung der Effektstärke wurden die Monozyten als CD14+ Population markiert. Die Behandlung mit der Testkomponente reduzierte die Anzahl von M1 Monozyten (CD14+CD64+) signifikant ( $72,95 \pm 1,49$  CD64+[%CD14+], p-Wert=0,008) im Vergleich zu der Methylzellulose Gruppe, die eine hohe Anzahl an M1 Monozyten aufwies ( $77,3 \pm 2,6$  CD64+[%CD14+]), siehe Abbildung 10. Die Frequenz an CD14+CD64+ Zellen war in der Infliximab Gruppe leicht reduziert im Vergleich mit der Isotyp Gruppe (Iso:  $74,2 \pm 2,14$  CD64+[%CD14+]; Infx:  $73,08 \pm 1,66$  CD64+[%CD14+]). M2 Monozyten (CD14+CD163+CD206+) konnten im Vergleich zur Methylzellulose Kontrollgruppe durch die Gabe der Testkomponente inhibiert werden (MZ:  $28,62 \pm 4,45$  CD163+CD206+ [%CD14]; MZ+TS:  $24,28 \pm 4,16$  CD163+CD206+ [%CD14]). Die Frequenz an M2 Monozyten war in der Infliximab Gruppe reduziert im Vergleich zur Isotyp Antikörper Gruppe (Iso:  $8,7 \pm 2,85$  CD163+CD206+ [%CD14]; Infx:  $22,64 \pm 3,65$  CD163+CD206+ [%CD14]).



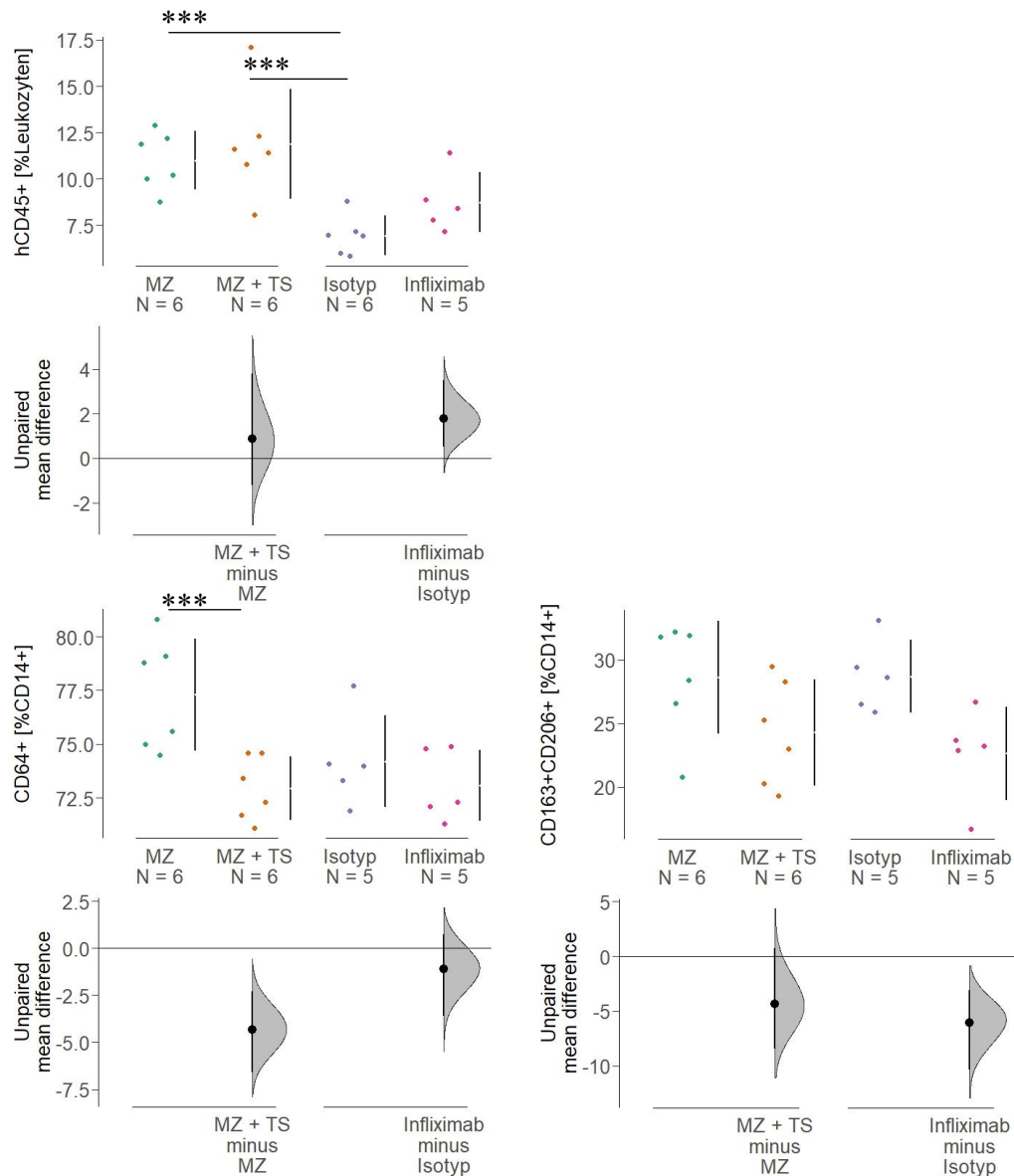


Abbildung 10: Oben: Frequenz humaner Leukozytenpopulationen als Cumming Plot. Unten: Subtypen der CD14+ Zellen als Cumming Plot

Zellen wurden aus der murinen Milz isoliert und in der Durchflusszytometrie gemessen. Frequenzen der humanen CD45+, der CD14+CD64+ und der CD14+CD163+CD206+ sind als Schwarmplots im oberen Bereich präsentiert. Paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen: MZ-Gruppe (N=12) verglichen mit der MZ+TS Gruppe (N=12), und eine Isotyp Gruppe (N=12) verglichen mit der Infliximab Gruppe (N=10). Standardabweichungen sind als vertikale Linien, mit dazwischen liegenden Mittelwerten angezeigt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Nulllinie, abhängig vom Mittelwert der Kontrolle. Die Punkte zeigen die Effektstärke (Mittelwertdifferenz) an. Die Fehlerbalken stellen das 95% Konfidenzintervall und die schattierten Flächen den Standardfehler dar. Es wurde eine ANOVA Analyse und post-hoc ein TukeyHSD durchgeführt. Mittelwerte, Standardabweichung und p-Werte sind im Anhang verfügbar. Die Signifikanzen wurden wie folgt festgelegt: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 ' '.



### Wirkung auf die T-Zellaktivierung

Der Monozyteninhibitor führte zu einer signifikant verminderten T-Zellaktivierung in der Zellpopulation CD4+CD134+ im Vergleich zur Methylzellulose Kontrollgruppe (MZ:25,12±4,71 CD134+[%CD4+]; MZ+TS:7,9±2,52 CD134+[%CD4+]; p-Wert= 0,0001), ersichtlich in Abbildung 11. Die Applikation von Infliximab reduzierte die Frequenz an CD4+CD134+ deutlich im Vergleich zur Isotyp Kontrollgruppe (Iso:17,89±8,4 CD134+[%CD4+]; Infx:9,84±3,87 CD134+[%CD4+]). Die T-Zellen CD4+CD103+ zeigten eine geringere Aktivierung bei Gabe der Testkomponente im Vergleich zur MZ Gruppe (MZ:22,52±3,95 CD134+[CD4+]; MZ+TS:18,45±1,82 CD134+[CD4+]). Die Applikation von Infliximab zeigte keinen Effekt auf die CD4+CD103+ Zellen im Vergleich zur Isotyp Gruppe. Den größten Effekt des Monozyteninhibitors wurde in der Inhibition der T-Zellpopulation CD4+CD25+ beobachtet im Vergleich zur Kontrollgruppe (MZ:57,05±4,65 CD25+[CD4+]; MZ+TS:42,53± CD25+[CD4+]; p-Wert= 0,00002). Die Applikation von Infliximab führte zu einer verringerten Aktivierung der CD4+CD25+ Zellen im Vergleich zur Isotyp Kontrolle (Iso:52,58±5,89 CD25+[CD4+]; Infx:48,83±1,66 CD25+[CD4+]). Zusammenfassend kann eine deutliche Inhibition der T-Zellen durch die Applikation der Testkomponente beobachtet werden, dies wird in der Abbildung 11 durch die *Cumming Plots* visualisiert. Die hohen Frequenzen der Zellpopulationen in der MZ Gruppe werden durch eine weite Streuung der Schwarmplots widergespiegelt. Im Vergleich dazu clustern die Daten der MZ+TS Gruppe sehr dicht zusammen. Im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und MZ+TS Gruppe schneidet kein Konfidenzintervall die Achse (Nulllinie), dies spricht für eine große Differenz der Werte. Die Annahme das der Monozyteninhibitor die Aktivierung der T-Zellen deutlich inhibieren konnte, wird durch die stark inversen Effektstärken bestärkt, insbesondere bezüglich der CD4+CD134+ Population und der CD4+CD25+ Population.

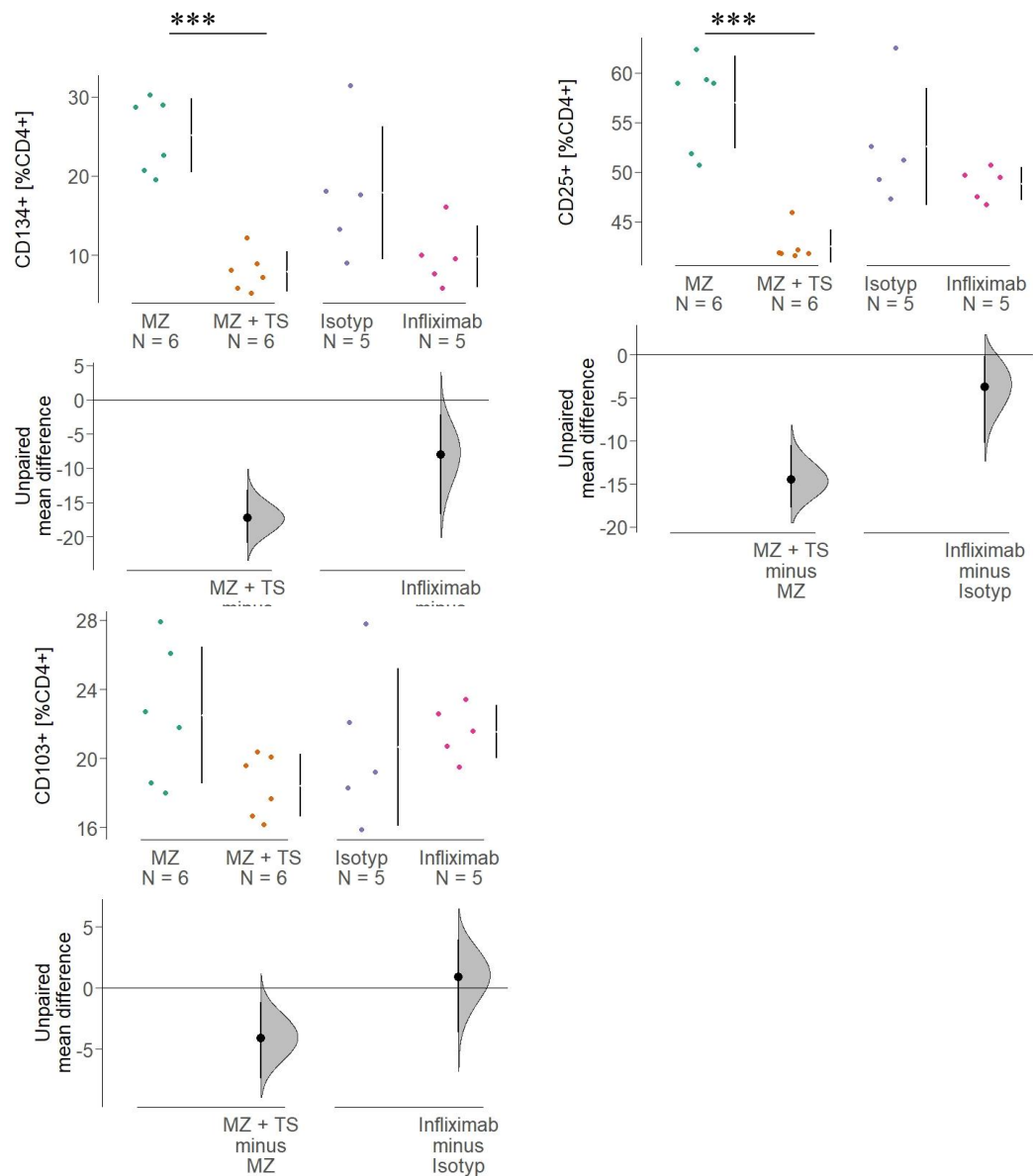


Abbildung 11: Frequenz aktivierter T- Zellen als Cumming Plot

Zellen wurden aus der murinen Milz isoliert und in der Durchflusszytometrie gemessen. Frequenzen der Populationen CD4+CD134+, der CD4+CD252+ und der CD4+CD103+ sind als Schwarmplots im oberen Bereich präsentiert. Paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen: MZ-Gruppe (N=12) verglichen mit der MZ+TS Gruppe (N=12), und eine Isotyp Gruppe (N=12) verglichen mit der Infliximab Gruppe (N=10). Standardabweichungen sind als vertikale Linien, mit dazwischen liegenden Mittelwerten angezeigt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Nulllinie, abhängig vom Mittelwert der Kontrolle. Die Punkte zeigen die Effektstärke (Mittelwertdifferenz) an. Die Fehlerbalken stellen das 95% Konfidenzintervall und die schattierten Flächen den Standardfehler dar. Es wurde eine ANOVA Analyse und post-hoc ein TukeyHSD durchgeführt. Mittelwerte, Standardabweichung und p-Werte sind im Anhang verfügbar. Die Signifikanzen wurden wie folgt festgelegt: 0'\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.

### Wirkung auf die B-Zellen

Inhibitorische Effekte des Monozyteninhibitors auf die T-Zellen konnte insbesondere in der Frequenz der CD19<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden, die vergleichsweise zu der Population der Kontrollgruppe signifikant reduziert war (MZ:64,77±8,25 CD19[%Leukozyten], MZ+TS:56,08±2,95 CD19[%Leukozyten]; p-Wert=0,043), siehe Abbildung 12. Die Applikation von Infliximab erzielte im Vergleich zur Isotyp Kontrolle eine signifikante Inhibition der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) (Iso:64,18±4,63 CD19[%Leukozyten], Infx:50,9±1,9 CD19 [%Leukozyten], p-Wert=0,004). Deutliche Effekt der Testkomponente konnten in der Ausbildung der CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden, deren Population signifikant vermindert war verglichen mit der CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Population der Kontrollgruppe (MZ:27,84±17,42 CD38+[%CD19+]; MZ+TS:7,99±3,76 CD38+[%CD19+], p-Wert=0,017). Die Zellpopulation von CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> war im Vergleich zur Isotyp Gruppe deutlich vermindert (Iso:24,18±8,66 CD38+[%CD19+], Infx:6,4±1,94 CD38+[%CD19+]). Der Monozyteninhibitor erzielte eine signifikante Inhibition der Ausbildung von CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> Zellen im Vergleich zur MZ Gruppe (MZ:40,2±3 CD27+IgD-[%CD19+], MZ+TS:30,97±5,13 CD27+IGgD-[%CD19+], p-Wert=0,021). Eine signifikant reduzierte CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IGD<sup>-</sup> Population wies auch die Infliximab Gruppe im Vergleich zur Isotyp Kontrolle auf (Iso:32,54±6,13 CD27IGD-[%CD19+], Infx:21,6±5,18 CD27IGD-[%CD19+], p-Wert=0,012). Den stärksten Effekt hatte die Applikation der Testkomponente auf die CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Population mit einer signifikanten Inhibition verglichen mit der MZ Gruppe (MZ:65,72±2,2 CD27-IgD+[%CD19], MZ+TS:50,85±5,79 CD27-IgD+[%CD19], p-Wert=0,005). Kein Unterschied konnte zwischen der Isotyp Kontrolle und der Infliximab Gruppe festgestellt werden.

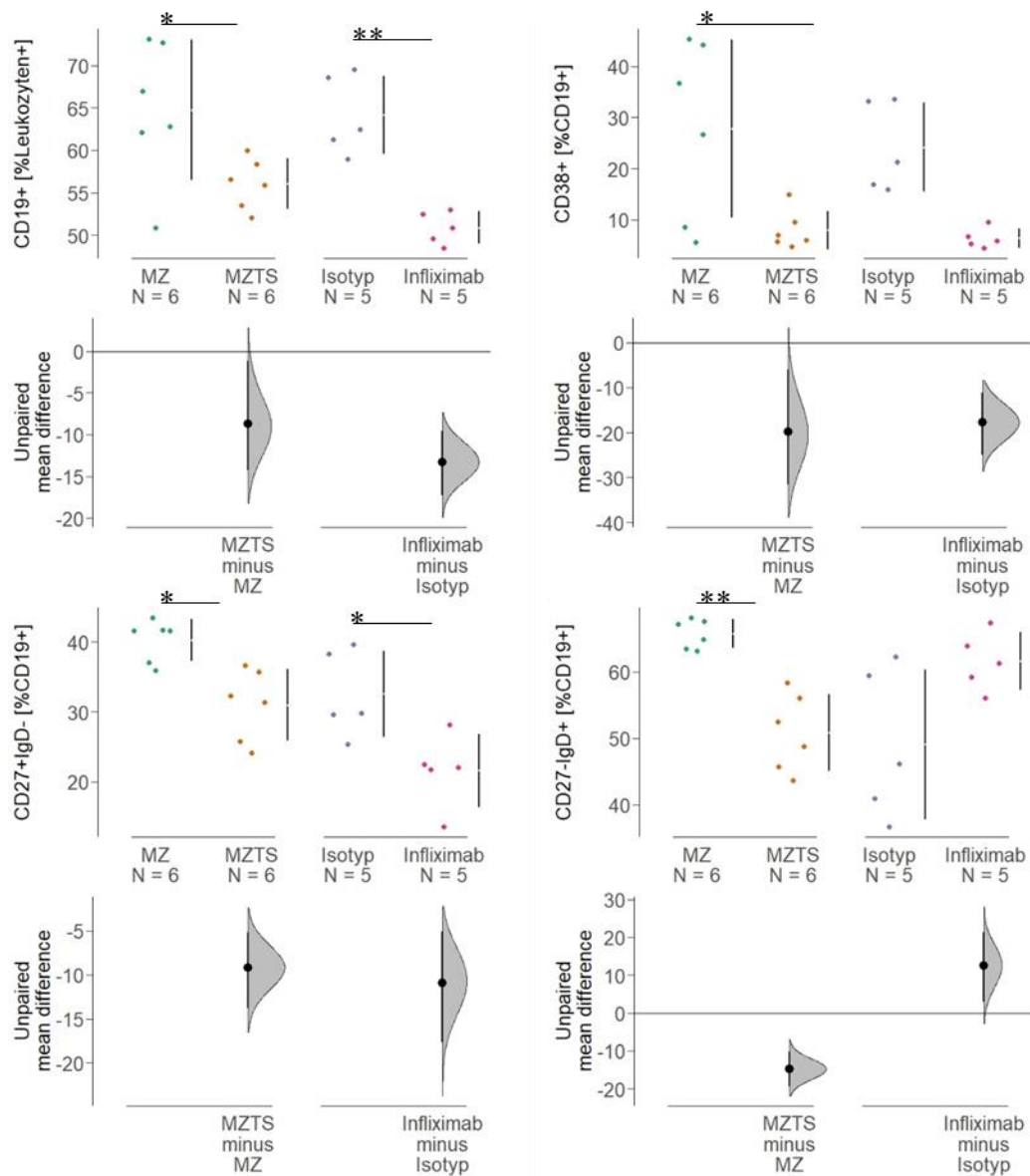


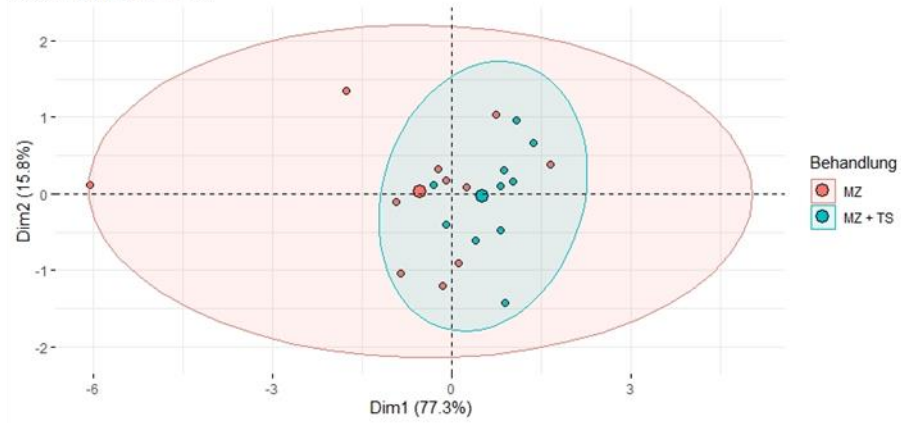
Abbildung 12: Frequenz der Subtypen der B-Zellen (CD19+) als Cumming Plot

Zellen wurden aus der murinen Milz isoliert und in der Durchflusszytometrie gemessen. Frequenzen der Populationen CD19+ der CD19+CD38+, der CD19+CD27+IgD- und CD19+CD27-IgD+ sind als Schwarmplots im oberen Bereich präsentiert. Paarweiser Vergleich zwischen den Gruppen: MZ-Gruppe (N=12) verglichen mit der MZ+TS Gruppe (N=12), und eine Isotyp Gruppe (N=12) verglichen mit der Infliximab Gruppe (N=10). Standardabweichungen sind als vertikale Linien, mit dazwischen liegenden Mittelwerten angezeigt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Nulllinie, abhängig vom Mittelwert der Kontrolle. Die Punkte zeigen die Effektstärke (Mittelwertdifferenz) an. Die Fehlerbalken stellen das 95% Konfidenzintervall und die schattierten Flächen den Standardfehler dar. Es wurde eine ANOVA Analyse und post-hoc ein TukeyHSD durchgeführt. Mittelwerte, Standardabweichung und p-Werte sind im Anhang verfügbar. Die Signifikanzen wurden wie folgt festgelegt: 0\*\*\*\* 0.001 \*\* 0.01 \* 0.05.

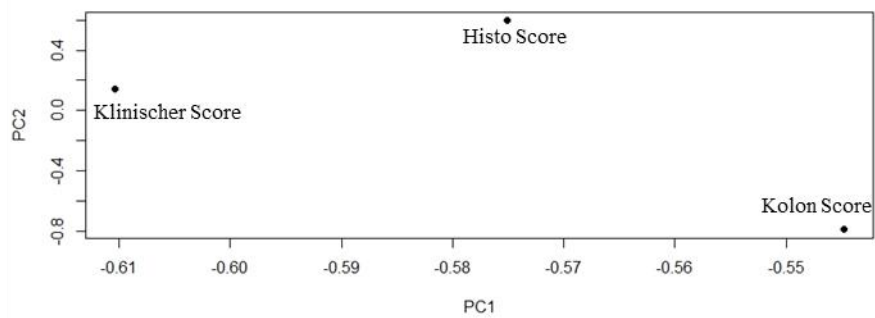
### 5.2.3 Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis, PCA*) zur Beurteilung der Wirkung im Mausmodell

Zur Beurteilung der Zusammenhänge zwischen den gemessenen Leukozyten in der Milz und dem klinischen Bild der Kolitis im Mausmodell wurden vier Hauptkomponentenanalysen (*Principal Component Analysis, PCA*) durchgeführt, bestehend aus dem histologischen Score, dem klinischen Score und dem makroskopischen Kolon Score sowie den Leukozyten der Milz insbesondere die Populationen der M1 Monozyten (CD14+CD64+), M2 Monozyten (CD14+CD163+CD206+) und die aktivierten T-Zellen CD4+CD134+. Verglichen wurden jeweils die Gruppen: eine Kontrollgruppe (MZ) verglichen mit der Testkomponente (MZ+TS) sowie eine Isotyp Kontrolle verglichen mit einer Infliximab Gruppe. Die PCA Analyse A1 der Scores, siehe Abbildung 13, zwischen den Gruppen Methylzellulose und Testkomponente verdeutlicht, dass die Werte der Testkomponente aus dem histologischen, klinischen Score und Kolon Score dicht zusammen clustern, während Tiere aus der Methylzellulose Gruppe eine große Varianz aufweisen. Die PCA Analyse A2 stellt die Abspaltung der Isotyp Antikörper Gruppe von der Infliximab Gruppe basierend auf den Scores dar. Die Applikation der Testkomponente führt zu einer geringen Varianz bezüglich der Frequenz von Leukozyten in der Milz, folglich spaltet sich die Kontrollgruppe mit einer weiten Streuung der Werte ab, siehe PCA Analyse B1, vergleiche Abbildung 14. Die PCA Analyse B2 visualisiert den Zusammenhang zwischen der Isotyp Antikörper Gruppe und Infliximab bezüglich der Zellpopulationen. Auffällig ist hierbei eine Separation der Isotyp Antikörper Gruppe von der Infliximab Gruppe, siehe Abbildung 14.

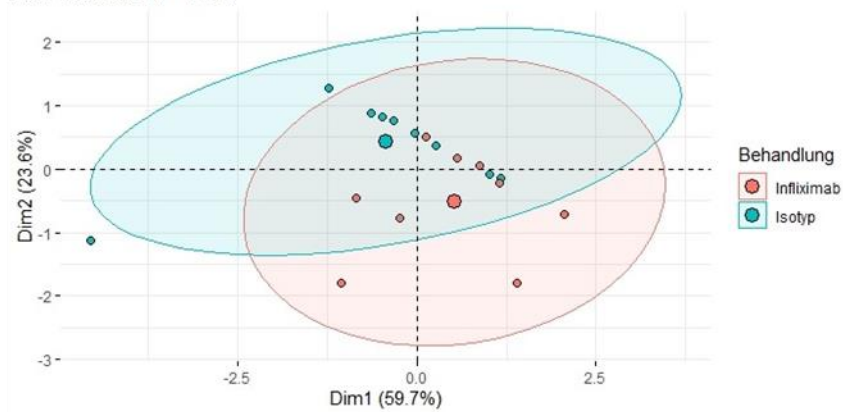
## A.1 Individuals - PCA



## Loadings



## A.2 Individuals - PCA



## Loadings

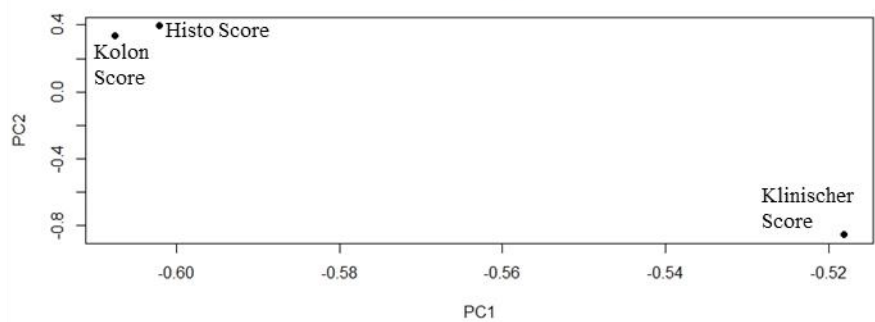


Abbildung 13: PCA der klinischen Scores

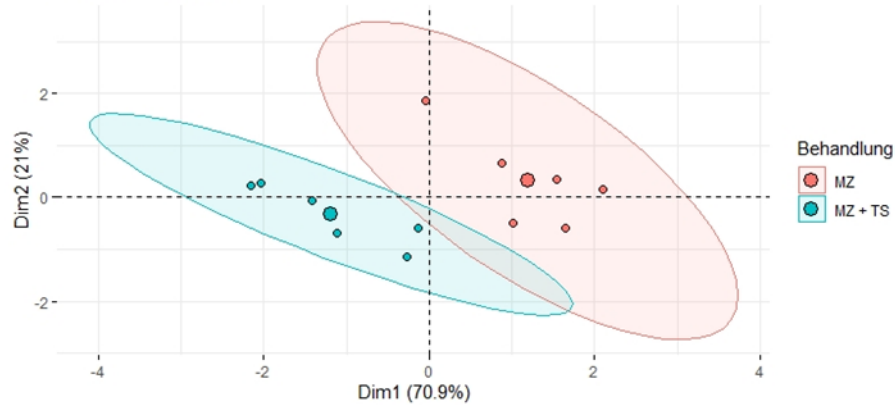
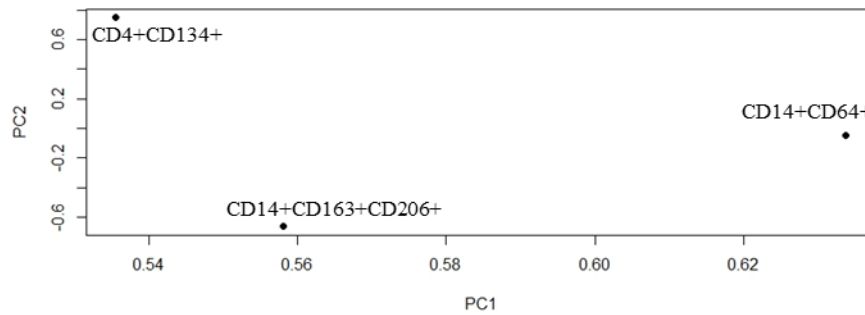
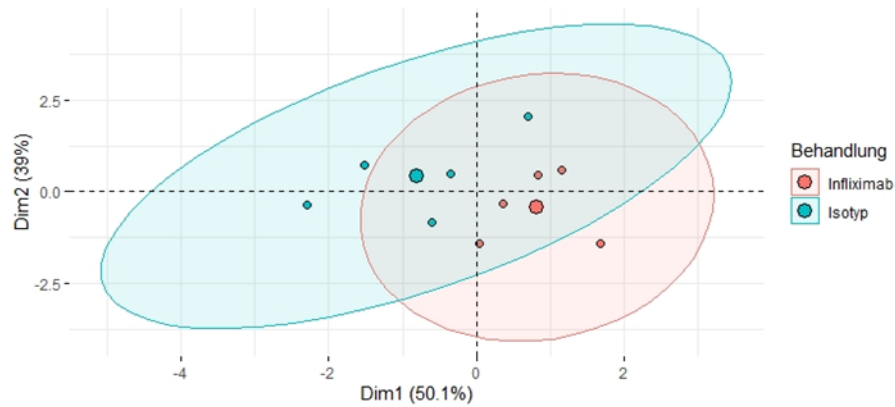
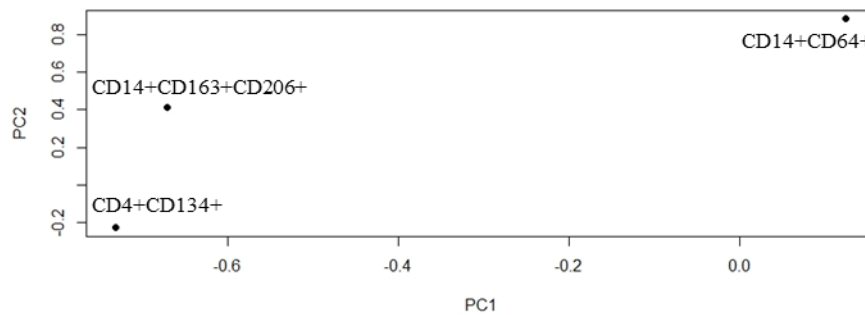
**B.1 Individuals - PCA****Loadings****B.2 Individuals - PCA****Loadings**

Abbildung 14: PCA der Zellpopulationen CD4+CD134+, CD14+CD64+ (M1 Monozyten), CD14+CD163+CD206 (M2 Monozyten)

Die PCA Analysen wurden zur Beurteilung der Wirkung von 10mg/kg Testkomponente im Mausmodell als paarweiser Vergleich durchgeführt: MZ-Gruppe (N=12) verglichen mit der MZ+TS Gruppe (N=12), und eine Isotyp Kontrolle (N=12) verglichen mit der Infliximab Gruppe (N=10). im oberen Feld sind die PCA Scores mit ihrem 95% Konfidenzintervall aufgetragen. Im unteren Feld sind die Loadings geplottet.

#### 5.2.4 Pearson Korrelation zur Bewertung des Zusammenhanges zwischen Leukozyten in der Milz und dem klinischen Bild der Kolitis im Mausmodell

Um den Effekt der Testkomponente im Mausmodell zu bewerten, wurden folgende Parameter in Zusammenhang gesetzt: histologischer Score, klinischer Score und makroskopischer Kolon Score sowie die Leukozytenpopulationen der M1 Monozyten (CD14+CD64+), der M2 Monozyten (CD14+CD163+CD206+) und die CD4+CD134+ Population aus der Milz, siehe Abbildung 15. Der makroskopische Kolon Score korreliert positiv und signifikant mit dem histologischen Score. Ein positiver und signifikanter Zusammenhang lässt sich zwischen dem M1 Monozyten und dem histologischen Score herstellen. Signifikanzen und positive Korrelationen gibt es zwischen den M2 Monozyten und dem makroskopischen Kolon Score, sowie dem klinischen Score und dem makroskopischen Kolon Score. Die Zellpopulationen CD4+CD134+ korrelieren signifikant und positiv mit der M2 Monozyten Population. Die M1 Monozyten korrelieren mit den M2 Monozyten positiv und signifikant vergleiche dazu Tabelle 11.

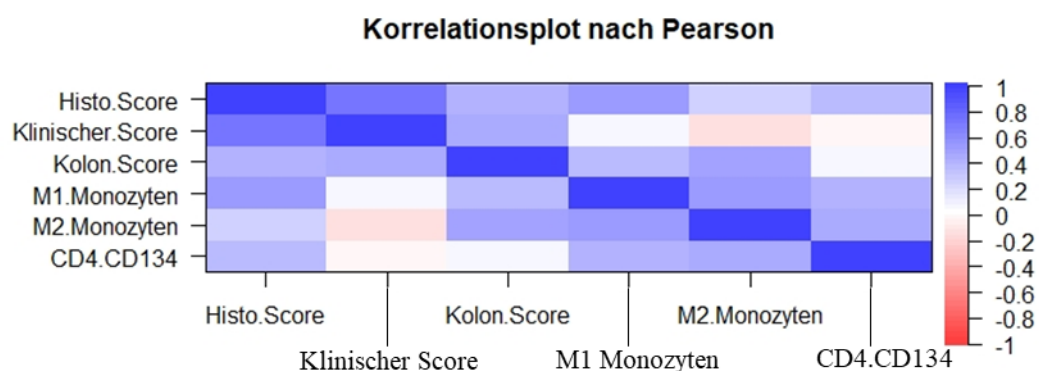


Abbildung 15: Korrelationsmatrix nach Pearson

Bewertung des Zusammenhanges zwischen dem klinischen, histologischen und makroskopischen Kolon Score (Kolon Score) sowie den M1 Monozyten (CD14+CD64+), den M2 Monozyten (CD14+CD163+CD206+) und den aktivierten T-Zellen (CD4+CD134+). Der Korrelationsplot zeigt den Einfluss, den verschiedene Parameter aufeinander ausüben. Statistisch signifikante und positiv



korrelierte Parameter sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Färbung veranschaulicht den Korrelationsgrad. Die Werte korrelieren mit sich selbst am stärksten (dunkelblau) und in Abstufungen zu rot (geringe Korrelation) sind die Werte aufgetragen. Der Plot untermauert die Annahme das die Tiere von der Applikation der Testkomponente profitieren. Eine Inhibition der M1 Monozyten korreliert mit dem histologischen Score, der in dieser Gruppe gering ausfiel. In vivo erzielte Effekte der Testkomponente können als Gesamtbild mit dem Korrelationsplot bewertet werden.

*Tabelle 11: Statistiktabelle zu der Korrelationsmatrix nach Pearson*

Signifikanzen zwischen den Gruppen	Korrelation	p-Werte
Makroskopischer Kolon Score ~ Histologischer Score	0,40	0,01
M1 Monozyten ~ Histologischer Score	0,51	0,01
M2 Monozyten ~ Makroskopischer Kolon Score	0,47	0,03
Klinischer Score ~ Makroskopischer Kolon Score	0,43	0,04
M2 Monozyten ~ M1 Monozyten	0,52	0,01
CD4+CD134+ ~ M2 Monozyten	0,42	0,05

### 5.2.5 Wirkung auf die Sekretion von Zytokinen

Der Effekt der Testkomponente die Ausschüttung von Zytokinen wurde anhand von Kolon Extrakten aus den verschiedenen Testgruppen mittels Luminex Analyse untersucht. Verglichen wurden als paarweiser Vergleich: 0.5% Methylzellulose gelöst in H<sub>2</sub>O (MZ) verglichen mit 10 mg/kg Testkomponente gelöst in 0.5% Methylzellulose/H<sub>2</sub>O (MZ+TS) sowie 6mg/kg Isotyp Antikörper (Iso.) verglichen mit 6 mg/kg Infliximab (Inflx.). Die Applikation der Testkomponente führte zu einer verminderten Sekretion von Interleukin-17A im Vergleich zur Kontrollgruppe (MZ:9,92±0,8pmol/mL;MZ+TS:9±0,63pmol/mL), ersichtlich in Abbildung 16. Effekte der Testkomponente zeigten sich auch auf die Sekretionslevel von C-reaktivem Protein (CRP), die verglichen mit der Kontrolle deutlich vermindert waren (MZ:3928,17±634,55 pmol/mL;MZ+TS:2802,83±1947,91pmol/mL). Kein Effekt wurde zwischen dem Zytokin Level des CRP der Isotyp Antikörper Gruppe und Infliximab festgestellt. Der Monozyten Inhibitor erzielte eine verringerte Sekretion von TGFβ verglichen mit dem Zytokinspiegel der Kontrollgruppe (MZ:18,17±1,03pmol/mL; MZ+TS:16,67±0,52 pmol/mL). Die Therapie mit Infliximab hatte keine Effekte auf die Zytokin Level von TGFβ verglichen mit der Kontrolle. Der Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant.

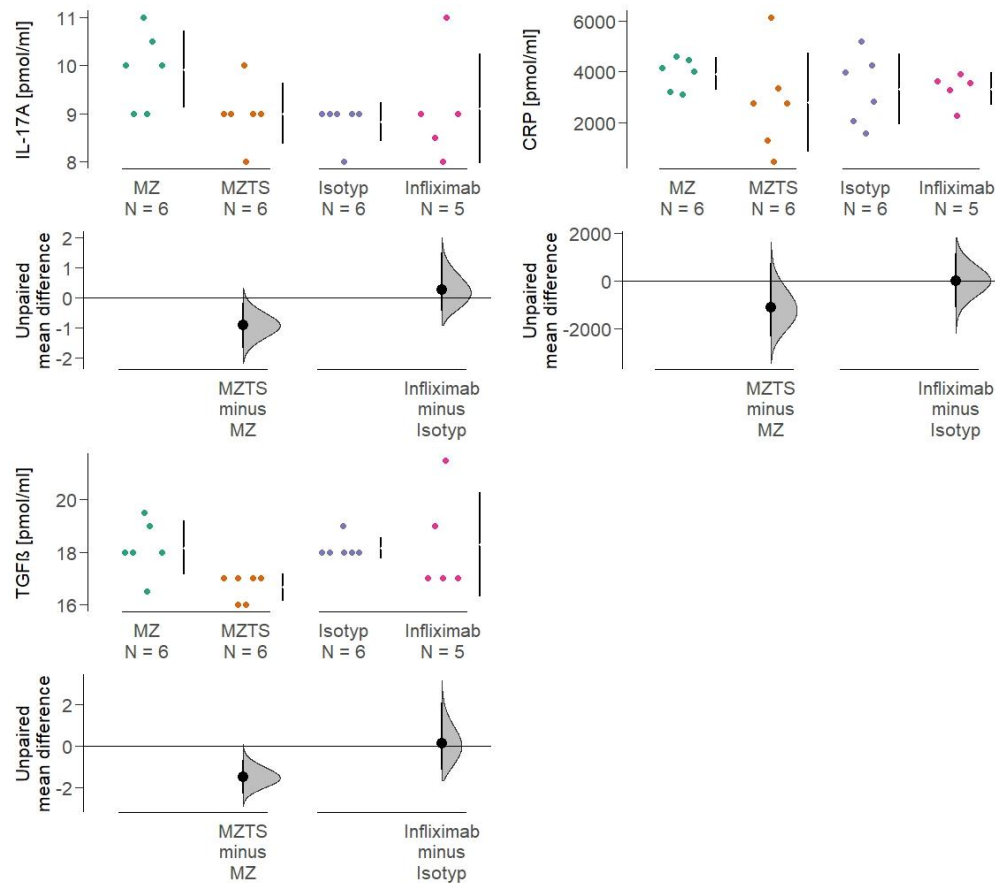


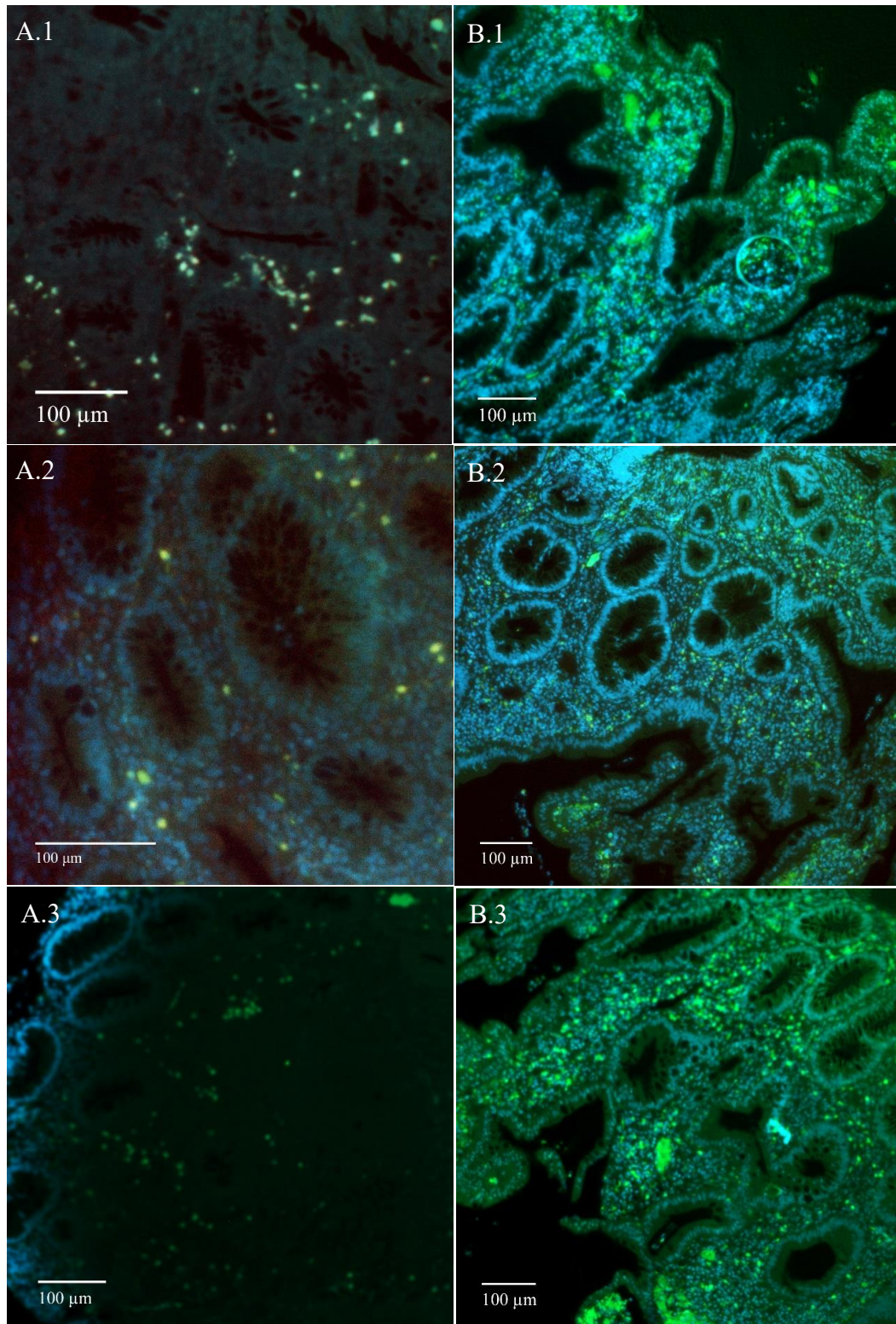
Abbildung 16: Zytokin Sekretion der aktivierten T-Zellen als Cumming Plot. Zytokinlevel von IL-17A, CRP, TGFβ

Vergleich zwischen den Gruppen: Kontrollgruppe behandelt mit 0.5% Methylzellulose (MZ) in H<sub>2</sub>O gelöst, 10 mg/kg Testkomponente in 0.5% Methylzellulose/H<sub>2</sub>O (MZ+TS) gelöst; 6 mg/kg Isotyp Antikörper als Kontrollgruppe und 6mg/kg Infliximab. Im oberen Bereich sind die Werte als Schwarmplot aufgetragen. Standardabweichungen sind als vertikale Linien, mit dazwischen liegenden Mittelwerten angezeigt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Nulllinie, abhängig vom Mittelwert der Kontrolle. Die Punkte zeigen die Effektstärke (Mittelwertdifferenz) an. Die Fehlerbalken stellen das 95% Konfidenzintervall und die schattierten Flächen den Standardfehler dar. Die Unterschiede zwischen den Gruppen fielen bezüglich der Zytokinlevel sehr gering aus, die 95% KI schneiden die Differenzachse (Nulllinie). Den größten Effekt erzielte die Testkomponente auf die Zytokinlevel von IL-17A, das 95% KI liegt unter der Differenzachse und unterscheidet sich vom Mittelwert der Kontrollgruppe.

### ***5.3 Visualisierung humaner Monozyten mittels Immunhistochemie***

#### ***5.3.1 Analyse von humanen Kolonbiopsien***

Um die Beurteilung der Monozyten an der Inflammation bei UC zu demonstrieren, wurde eine immunhistologische Analyse von humanen Kolonbiopsien durchgeführt. Es wurden Monozyten (CD14+), der T-Zellen (CD4+, CD8+) und der B-Zellen (CD19+) angefärbt. Entnommen wurde jeweils eine Biopsie aus makroskopisch pathologisch verändertem Gewebe (UC4X, inflammatorisch) und eine Biopsie aus makroskopisch unverändertem Gewebe (UC4, nicht inflammatorisch). Die IHC-Färbung der Bilder A.1 bis B.3, siehe Abbildung 17, stellt das histologische Bild der Biopsien des Spenders dar. Das pathologisch veränderte Gewebe, die Aufnahmen B.1 bis B.3, weisen einen hohen Einstrom von Monozyten (CD14+) und T-Zellen (CD4+, CD8+) auf im Vergleich zu der nicht inflammatorischen Probe, A1 bis A.3.



*Abbildung 17: IHC Färbung der Biopsie. A.1-A.3 Nicht inflammatorische Biopsie. B.1-B.3 Inflammatorische Biopsie*

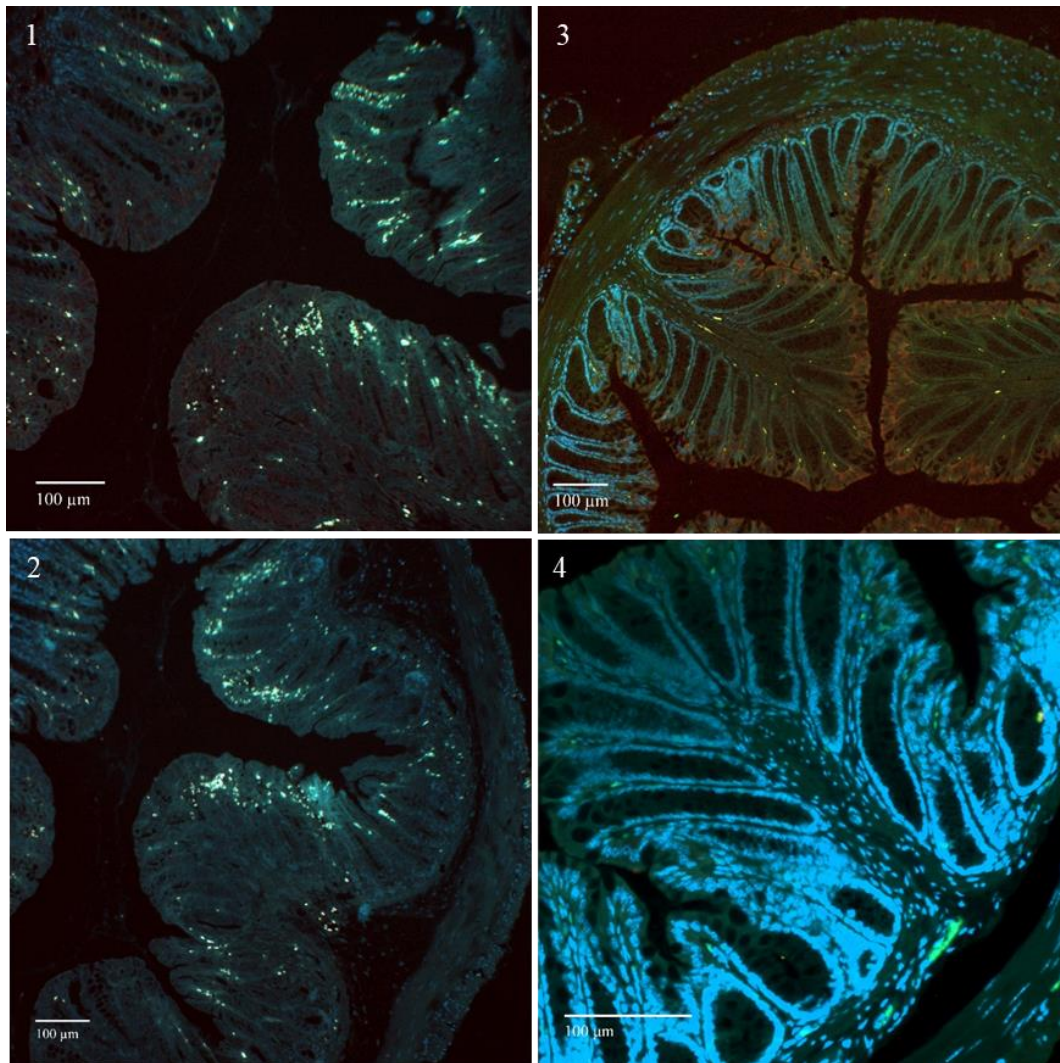
1: Anfärbung der CD4+ Zellen (T-Zellen), 2: Anfärbung der CD14+Zellen (Monozyten), 3: Anfärbung der CD19+ Zellen (B-Zellen).

### 5.3.2 Effekte des Monozyteninhibitors

Zur abschließenden Bewertung der Effektstärke der Testkomponente im NSG-UC Mausmodell wurde jeweils ein Kolonschnitt aus den behandelten Gruppen betrachtet und angefärbt: 0.5% Methylzellulose gelöst in H<sub>2</sub>O (MZ), 10 mg/kg Testkomponente gelöst in 0.5% Methylzellulose/H<sub>2</sub>O (MZ+TS) sowie der Isotyp Antikörper (Iso.) und Infliximab (Inflx.). Zur Markierung der Monozytenpopulation wurde der Marker CD14+ für die T-Zellen die Oberflächenmarker CD4+ und CD8+ für die T-Zellen, sowie für die B-Zellen CD19+ verwendet. Die Antikörper wurden als Primärantikörper auf das Gewebe aufgetragen und durch einen fluoreszierenden Zweitantikörper visualisiert, beschrieben im Protokoll für die IHC in Material und Methoden. Der Fluoreszenzfarbstoff liegt im grünen Farbspektrum.

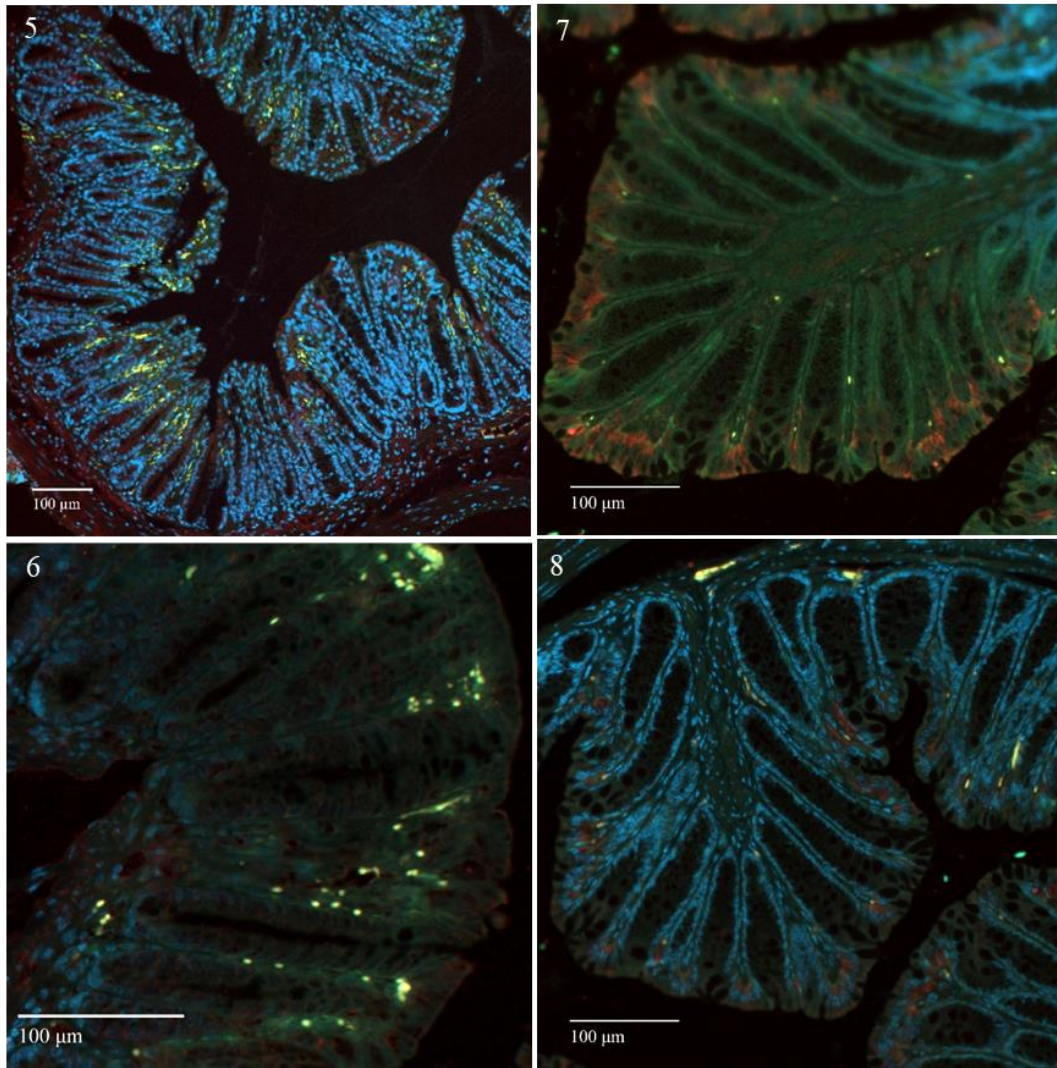
Das Kolon der MZ Kontrollgruppe weist in der IHC Färbung einen hohen Einstrom von T-Zellen (CD4+ und CD8+) auf, die sich vorrangig im Saum der Krypte nahe der *Lamina epithelialis mucosae* angeordnet haben, siehe Aufnahme 1 und 2, vergleiche Abbildung 18. Im Vergleich zur Kontrolle, zeigt das histologische Bild der MZ+TS Gruppe nur einen geringen Einstrom vereinzelter T-Zellen, siehe Aufnahme 3 und 4 in Abbildung 18. Die CD14+ Population und die CD19+ Population können auf der luminalen Seite der Krypte mittels Fluoreszenzfarbstoff visualisiert werden, in den Aufnahmen 5 bis 8 in Abbildung 19. Die Behandlung mit 10 mg/kg Testkomponente führt zu einem histologischen Bild mit einem sehr geringen Einstrom vereinzelter CD14+ und CD19+ Zellen im Vergleich zur Methylzellulose, in den Aufnahmen 7 und 8. Die Bilder 9 bis 12 zeigen einen histologischen Schnitt des Kolons aus der Isotyp Antikörper Gruppe, ersichtlich in Abbildung 20. Diese weist einen geringen Einstrom von CD4+ und CD14+ Zellen auf. Vereinzelte Zellen finden sich an der basalen Seite der Krypte. Tiere die mit 6 mg/kg Infliximab behandelt wurden, sind in den Aufnahmen 13 bis 16 dargestellt, siehe Abbildung 21. In der IHC Färbung können nur vereinzelte CD14+ Zellen, CD4+ Zellen und B-Zellen (CD19+) angefärbt werden. Das Gesamtbild der IHC aus den verschiedenen Behandlungsgruppen ist äquivalent zu den Zellpopulationen der Milz und des Kolons in der Durchflusszytometrie.





*Abbildung 18: IHC-Färbung des distalen Parts des Kolons, Vergleich zwischen der Methylzellulose Gruppe und 10 mg/kg Testkomponente*

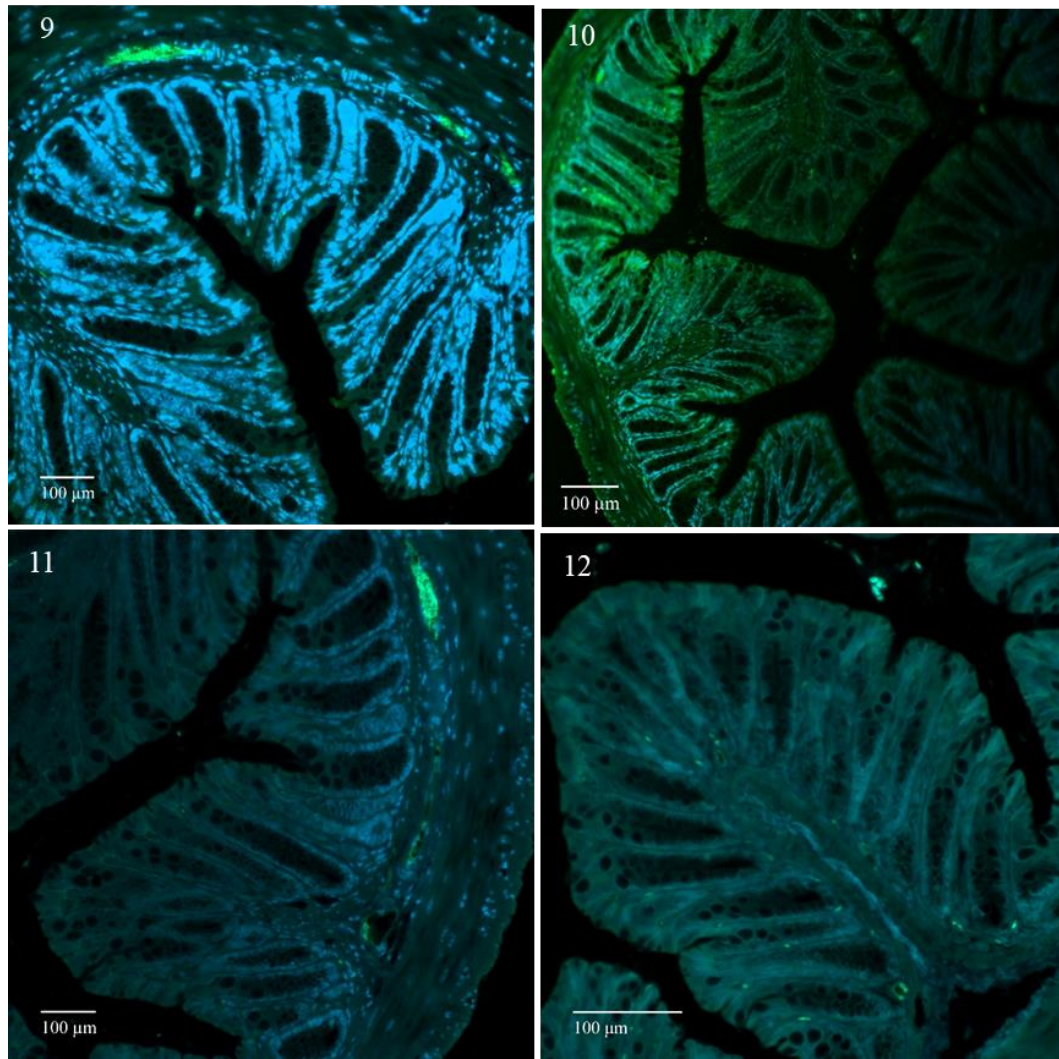
Links: Gruppe: 0.5% Methylzellulose gelöst in H<sub>2</sub>O (MZ). Rechts: 10 mg/kg Testkomponente gelöst in 0.5% Methylzellulose/H<sub>2</sub>O (MZ+TS) Antikörper. 1+3: Anfärbung CD4+Zellen (T-Zellen), 2+4: Anfärbung der CD8+Zellen(T Zellen).



*Abbildung 19: IHC Färbung des distalen Parts des Kolons, Vergleich der Methylzellulose und 10mg/kg Testsubstanz*

Links: 0.5% Methylzellulose gelöst in H<sub>2</sub>O (MZ). Rechts: 10 mg/kg Testkomponente gelöst in 0.5% Methylzellulose/H<sub>2</sub>O (MZ+TS) Antikörper. 5+7: Anfärbung CD14+Zellen (Monozyten), 6+8: Anfärbung der CD19+Zellen(B Zellen)

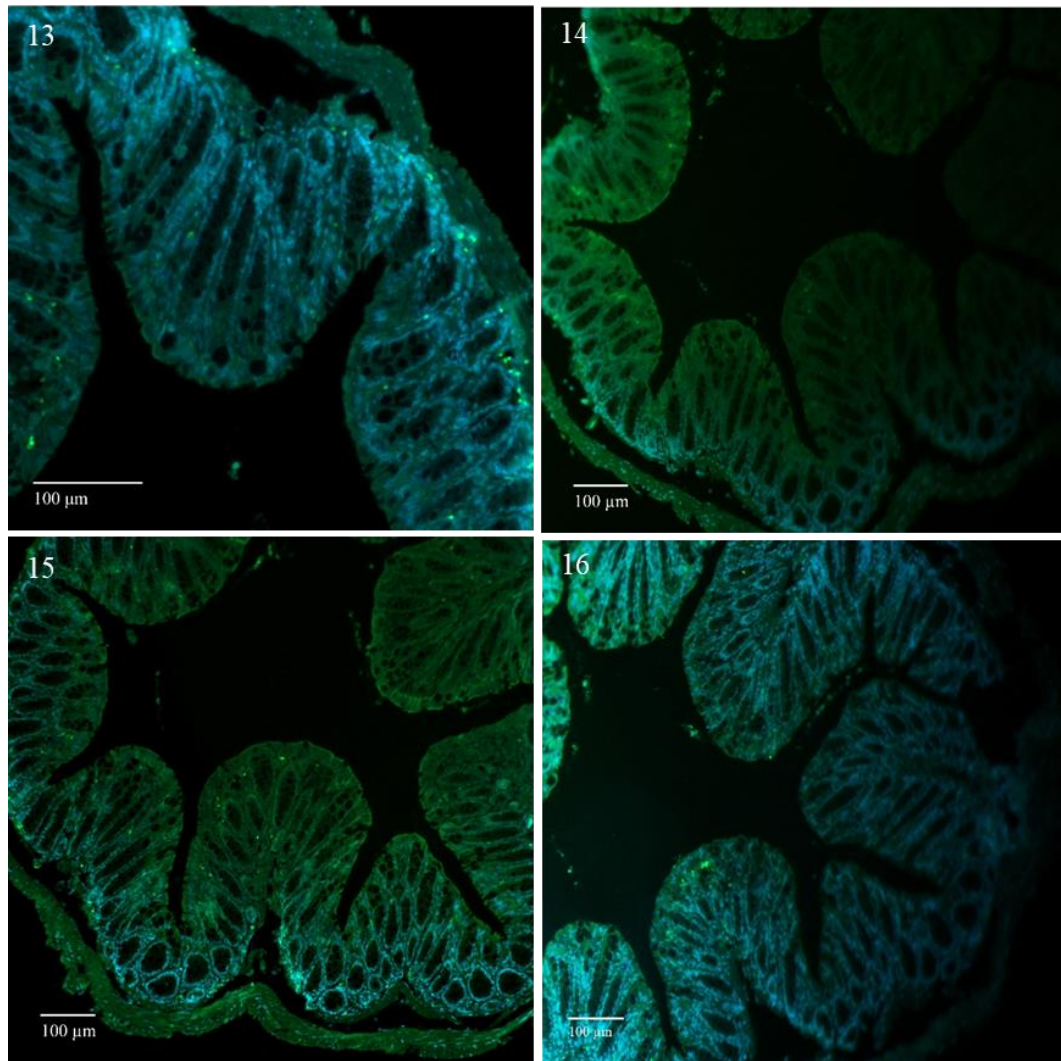




*Abbildung 20: IHC Färbung des distalen Parts des Kolons, Gruppe: 6 mg/kg Isotyp Antikörper*

9: Anfärbung CD4+Zellen (T-Zellen), 10: Anfärbung der CD8+Zellen (T-Zellen), 11: Anfärbung der CD14+ Zellen (Monozyten), 12: Anfärbung der CD19+Zellen (B-Zellen) Der Fluoreszenzfarbstoff liegt im grünen Farbspektrum zur Anfärbung von CD4,CD8,CD14,CD19





*Abbildung 21: IHC Färbung des distalen Parts des Kolons. Gruppe: 6mg/kg Infliximab*

13: Anfärbung CD4+Zellen (T-Zellen), 14: Anfärbung der CD8+Zellen (T-Zellen), 15:Anfärbung der CD14+ Zellen (Monozyten), 16: Anfärbung der CD19+Zellen (B-Zellen) Fluoreszenzfärbung der Oberflächenantigene CD4+ und CD8+ zur Anfärbung der T-Zellen, CD14+ zur Markierung der Monozyten und CD19+ zur Darstellung der B-Zellen. Der Fluoreszenzfarbstoff liegt im grünen Farbspektrum zur Anfärbung von CD4,CD8,CD14,CD19.



## 6 DISKUSSION

### 6.1 Ziel I: Immunprofilierung der Spender

#### 6.1.1 Hypothese 1: Die klinische Aktivität der Kolitis im Mausmodell ist abhängig vom Spender

Die Immunprofilierung der Spender zu Beginn der Studie erfolgte mit der Zielsetzung, die passenden Probanden für die Testung des Monozyteninhibitors *in vivo* auszuwählen. Spender A und B entsprachen den Erwartungen mit einem hohen Spiegel an M1 Monozyten und TH17-Zellen. Die Inflammation des Kolons wurde zum Zeitpunkt der Blutabnahme der Spender durch den Th17/Monozyten getriebenen Arm aufrecht erhalten (Jodeleit et al., 2019). Im Vergleich weist der Spender B einen ausgeprägteren Krankheitsverlauf der *Colitis ulcerosa* auf mit einem höheren SCCAI Wert sowie eine höhere Frequenz der M1 Monozyten und TH17-Zellen im Vergleich zu Spender A.

### 6.2 Ziel II: Monozyteninhibition als Therapieansatz

#### 6.2.1 Hypothese 2.1: Der Monozyteninhibitor erniedrigt den klinischen Aktivitätsscore

Den Erwartungen entsprechend reagierten die Tiere auf die rektale Applikation von Ethanol mit Gewichtsverlust und Tiere aus der Gruppe der Methylzellulose zeigten breiigen Kotabsatz. Die Applikation der Testkomponente führte zu einem geringen niedrigen klinischen Score mit zeitweise leichtem Gewichtsverlust an den Tagen 16 bis 18 nach rektaler Ethanol Applikation verglichen mit Tieren aus der Kontrollgruppe. Im Vergleich wiesen Tiere aus den Gruppen der Methylzellulose und der Testkomponente höhere Scores auf, als Tiere die mit dem Isotyp Antikörper oder Infliximab behandelt worden waren. Der Einfluss der Methylzellulose auf den klinische Aktivitätsscore ist prägnant. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass die orale Applikation von Carboxymethylzellulose, einem Derivat der Methylzellulose, bei Wildtypmäusen zu einer geringeren Inflammation der Kolonschleimhaut führte. Allerdings konnte auch in dieser Studie gezeigt werden, dass die Gabe von Methylzellulose bei genetisch veränderten Mäusen zur Entwicklung von *Kolitis* Symptomen führte

(Chassaing et al., 2015). Da Methylzellulose die gängige Formulierung für Testsubstanzen ist, muss die pro-inflammatorische Wirkung von Methylzellulose im NSG-UC Mausmodell weiter untersucht werden. Die Testsubstanz hatte keinen signifikanten Einfluss auf den klinischen Score.

Somit wurde diese Hypothese nicht bestätigt.

#### 6.2.2 *Hypothese 2.2: Der Monozyteninhibitor erniedrigt den makroskopischen Kolon Score*

Eine mittel- bis hochgradige Dilatation sind Anzeichen für die Ausbildung von Ödemen. Tiere aus der Kontrollgruppe zeigten zudem breiigen Kotabsatz und Einblutungen in die Darmschleimhaut. Die Applikation der Testkomponente führte zu geformtem Kot und bestätigt die Hypothese, dass die Symptome durch den Monozyteninhibitor gemildert werden können.

Somit wurde diese Hypothese bestätigt.

#### 6.2.3 *Hypothese 2.3: Der Monozyteninhibitor erniedrigt den histologischen Score*

Im histologischen Bild der Kontrollgruppe sind in der HE Färbung subepitheliale Ödeme mit Zellinfiltration zu beobachten, die Krypten sind von der *Lamina muscularis mucosae* gelöst. Im Vergleich dazu weist die Gruppe der Testkomponente nur geringe Ödeme auf, sowie eine niedrige Anzahl an Entzündungszellen. Die Folge der chronischen Inflammation bei *Colitis ulcerosa* ist die Ausbildung von Fibrose, definiert als exzessive Ansammlung von Kollagen und extrazellulärer Matrix, als Regenerationsversuch der Zellen auf den dauerhaften Reiz (Fiocchi et al., 2011). Die Kontrollgruppe wies an Stellen, die auch von Becherzellverlust betroffen waren, fibrotische Veränderungen auf mit vollständigem Verlust der Kryptenarchitektur. Diese Veränderungen wurden durch den Inhibitor unterdrückt. Becherzellen sind zusammen mit den Paneth Zellen für die Mukus Produktion des Kolons verantwortlich, der sich als schützende Schicht über die Epithelzellen legt. Bei *Colitis ulcerosa* kommt es zum Verlust der Becherzellen, einhergehend mit einer durchlässigen Mukusschicht (Parikh et al., 2019). Dieser Zellverlust wird auch im NSG-UC Mausmodell durch die PAS Färbung deutlich. Die Kontrollgruppe weist ähnlich wie im klinischen Bild einen hohen Becherzellverlust auf, die Testsubstanz verhindert den Verlust.

Somit wurde diese Hypothese bestätigt.

Insgesamt führte die Gabe des Monozyteninhibitors zu einer Verbesserung der drei Scores. Die Erniedrigung war jedoch in keinem Fall signifikant. Dies wurde auch durch die PCA Analyse deutlich, die keine endgültige Trennung der zwei Gruppen zeigte.

Somit ist die These nicht bestätigt, dass durch Inhibition der Monozyten allein die Entzündung unterdrückt werden kann.

### ***6.3 Ziel III: Die Wirkung des Monozyteninhibitors auf die in die Milz eingewanderten humanen Immunzellen***

#### ***6.3.1 Hypothese 3.1: Der Monozyteninhibitor erniedrigt die Frequenz von Monozyten***

Den Erwartungen entsprechend inhibierte die Applikation der Testsubstanz die Frequenz der M1 Monozyten Population CD14+CD64+ signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im DSS-induzierten Mausmodell konnten CD14+D64+-Monozyten als dominante Zellpopulation in der entzündeten Mukosa identifiziert werden, die nach Interaktion mit IgG Plasmazellen Zytokine ausschütteten und die Inflammation vorantrieben (Lin et al., 2019). M1 Monozyten (CD14+CD64+) und CD14+CD1a Monozyten werden der Gruppe der proinflammatorischen Monozyten zugeordnet (Jodeleit et al., 2019). Die CD14+CD1a+ Population zählt zu den proinflammatorischen Monozyten die TH22 Zellen aktivieren können (Al-Amodi et al., 2018). Erwartungsgemäß reduzierte die Testkomponente zudem die Frequenz an M2 Monozyten (CD14+CD163+CD206+) im Vergleich zur Kontrolle. M2 Monozyten sind für Wundheilungsprozesse verantwortlich (Jodeleit, Winkelmann, et al., 2020).

Die Wirkung des Inhibitors auf die Monozyten bestätigt die Hypothese, dass Monozyten spezifisch unterdrückt werden können.

#### ***6.3.2 Hypothese 3.2: Der Monozyteninhibitor inhibiert die T-Zellaktivierung***

CD25 ist ein genereller Marker bei der T-Zellaktivierung. Diese Aktivierung wird von einer vermehrten Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen begleitet (Van Assche et al., 2006). CD25 ist allerdings auch ein Marker für regulatorische T-Zellen, die durch die Expression des Transkriptionsproteins FoxP3 und den

IL2RA Rezeptor (CD25+) charakterisiert sind.(Akman et al., 2020; Raffin et al., 2020). Im Blut von Patienten mit Autoimmunerkrankungen konnten Defekte hinsichtlich Anzahl und Funktion der T<sub>reg</sub> Zellen festgestellt werden, eine Dysregulation wird als Ursache einer fehlregulierten Immunreaktion diskutiert (Dominguez-Villar et al., 2018). Der Monozyteninhibitor erreichte eine signifikante Reduzierung der CD4+CD25+ T-Zellen. Welche T-Zellen betroffen sind, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Ein weiterer T-Zell-Rezeptor ist OX40 (CD134) aus der Familie der TNF Moleküle, der auf aktivierten T-Zellen sowie unter anderem Makrophagen und dendritischen Zellen als Korezeptor exprimiert wird (Webb et al., 2016). Die Expression von OX40 auf aktivierten T-Zellen hält die T-Zell Immunantwort durch Kostimulation mit antigenpräsentierenden Zellen aufrecht und spielt eine wichtige Rolle in der klonalen Expansion naiver T-Zellen in Effektorzellen (Redmond et al., 2009). Die Frequenz der CD4+CD134+ Zellen wurde im Mausmodell durch die Applikation der Testkomponente stark reduziert. Die *memory* T-Zellen, die in der Mukosa präsent sind, weisen ein spezielles  $\alpha_E\beta_7$  Integrin (CD103) auf mit dem die T-Zellen an das E-cadherin auf Epithelzellen binden können (Corgnac et al., 2018). Die CD4+CD103+ Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den Chemokin Rezeptor CCR9, der die Chemotaxis zu dem Rezeptor CCL25, exprimiert auf den intestinalen Epithelzellen, vermittelt (Kulkarni et al., 2017).

In diesen Versuchen konnte die Hypothese bestätigt werden, dass durch die Inhibition von Monozyten in der Folge die T-Zell Aktivierung unterdrückt wird.

### 6.3.3 Hypothese 3.3: Der Monozyteninhibitor unterdrückt die Reifung von B-Zellen

Patienten mit *Colitis ulcerosa* weisen eine erhöhte Frequenz von CD19+ Plasmazellen in der entzündlich veränderten Mukosa auf, die durch Produktion von Antikörpern die Immunreaktion vorantreiben (Jinno et al., 2006). Naive B-Zellen benötigen zur Aktivierung Thymus-abhängiger Antigene Signale von *follicular helper T-cells* (T<sub>FH</sub>), die den Liganden CD40L exprimieren und IL-21 sekretieren, das wiederum STAT3 der B-Zellen aktiviert und zur Proliferation führt (Abos et al., 2020). Die T<sub>FH</sub> Zellen differenzieren sich aus naiven CD4+Zellen nach Kontakt mit Antigen präsentierenden Zellen (Pepper et al., 2011). Der Monozyteninhibitor reduziert die Frequenz an antigenpräsentierenden Zellen, zum einen den

Monozyten und den daraus entstehenden Dendritischen Zellen. Es kann angenommen werden, dass es durch die Inhibition der Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells/APC*, engl.) zu einer verminderten Differenzierung von T<sub>FH</sub> Zellen kommt, resultierend in einer reduzierten B-Zell Aktivierung. Die Aktivierung der B-Zellen durch direkten Kontakt mit Pathogenen scheint diesen Effekt nicht mildern zu können. Die Oberflächenmarker CD38+, ein Typ II Glykoprotein, wird auf Plasmazellen exprimiert und als therapeutischer Ansatz zur Regulation von Plasmazellen bei Autoimmunerkrankungen diskutiert (Cole et al., 2018). Die verminderte Differenzierung von naiven B-Zellen in Plasmazellen ist möglicherweise durch eine verminderte Ausbildung von T Effektorzellen beeinflusst.

Somit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass aufgrund der Monozyteninhibition infolge die B-Zellen inhibiert werden. Dies spiegelt sich in einer eindeutigen Auftrennung der Gruppen in der PCA Analyse wider.

#### ***6.4 Ziel IV: PCA Analyse und Korrelation nach Pearson zur Bewertung der Effekte des Monozyteninhibitors im Tiermodell***

##### *6.4.1 Hypothese 4.1: Die Testsubstanz ist wirksam im Mausmodell*

Die PCA Analyse wurde angewandt um die *in vivo* Effekte von der Testkomponente als Zusammenhang zwischen der klinischen *Kolitis* der Tiere im Mausmodell und den gemessenen Leukozyten Populationen in der Milz zu bewerten. Die PCA Analyse wurde gewählt um die Dimensionen des Datensatzes mit geringem Informationsverlust zu reduzieren (Jolliffe et al., 2016).

Die Korrelationsmatrix nach Pearson ist im Wertebereich -1 bis +0 skaliert, wobei die Werte die mit sich selbst korrelieren eine Linie bilden (Pearson Korrelation) mit einem absoluten Wert von 1 (Schober et al., 2018). Die Inhibition der M1 Monozyten steht im Zusammenhang mit einem geringen histologischen Score. Während der makroskopische Kolon Score mit der Inhibition der M2 Monozyten im Zusammenhang steht. Die Applikation der Testkomponente hatte Effekte auf die T-Zell/Monozytenachse, die Inhibition der M2 Monozyten beeinflusste die Frequenz der aktivierten T-Zellen (CD4+CD134+). Der histologische Score steht im Zusammenhang mit dem makroskopischen Kolon Score, makroskopische Veränderungen konnten durch die Zellen in der Histologie bestätigt werden.

Äquivalent dazu spiegelte sich ein hoher klinischer Score in dem makroskopischen Kolon Score sichtbar wider. Eine Inhibition der Monozyten zeigte deutliche Effekte auf die M1 Monozytenpopulation sowie auf die Frequenz der M2 Monozyten.

Die Annahme das die Applikation der Testkomponente Effekte im Mausmodell zeigt, konnte bestätigt werden.

### ***6.5 Ziel V: Wirkmechanismus der Testkomponente auf die Zytokinausschüttung und CRP***

#### ***6.5.1 Hypothese 5.1: Die Testkomponente erniedrigt die Zytokinausschüttung und CRP***

Die Infiltration von CD4+ T-Zellen in die Mukosa geht mit einer erhöhten Sekretion von Zytokinen einher und spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der *Colitis ulcerosa* (Feng et al., 2020). *Colitis ulcerosa* wird als TH2-vermittelte Erkrankung beschrieben, mit Sekretion von IL-5 und IL- 3 (Danese et al., 2011). Eine Dysregulation der TH17/Treg Zellen führt zu einer vermehrten Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-17, IL-22) und einer Dysregulation der inhibitorischen Zytokine TGF $\beta$  und IL-10, resultierend in einer fehlgeleiteten Immunreaktion (Luo et al., 2017). Die Applikation des Monozyteninhibitors konnte die Spiegel von IL-17A und TGF $\beta$  reduzieren. C-reaktives Protein (CRP) ist ein Marker für Inflammation. Ein geringes Serumalbumin zusammen mit einem hohen CRP Wert weisen auf einen schweren Krankheitsverlauf der *Colitis ulcerosa* hin (Sayar et al., 2020). Die Reduzierung des CRP Wertes in der Testkomponenten Gruppe, gebildet von Plasmaproteinen als erste Abwehr, geht einher mit den reduzierten proinflammatorischen Zytokinen.

Somit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass inflammatorische Zytokinspiegel erniedrigt werden. Die Tatsache, dass der CRP-Wert nicht erniedrigt wurde, spricht für eine unzureichende Unterdrückung der Inflammation.



## **6.6 Ziel VI: Darstellung der Inflammation in der immunhistochemischen Färbung**

### *6.6.1 Hypothese 6.1: Die Inflammation ist auch in humanen Biopsien von Monozyten bestimmt*

Dem Spender B wurden zwei Biopsien entnommen, eine Biopsie aus einem nicht inflammatorischen Bereich und eine Biopsie aus einem inflammatorischen Bereich. Von den Biopsien wurden histologische Schnitte angefertigt und eine IHC-Färbung durchgeführt. Erwartungsgemäß wurden in der Biopsie aus der inflammatorischen Mukosa ein vermehrter Einstrom von CD14+ Monozyten in die Krypten beobachtet im Vergleich zur nicht entzündlichen Kontrolle. Die Anzahl an CD4+ und CD8+ T-Zellen war erhöht in der inflammatorischen Biopsie Probe im Vergleich zum nicht entzündlichen Gewebe.

Somit wurde die Hypothese bestätigt.

### *6.6.2 Hypothese 6.2: Die Wirkung der Testsubstanz wird in der Immunhistochemie deutlich*

Von den histologischen Kolon Schnitten aus den einzelnen Gruppen wurde jeweils eine IHC Färbung angefertigt. Angefärbt wurden mittels Fluoreszenzfarbstoff die CD14+ Monozyten, CD19+ B-Zellen sowie CD4+ und CD8+ T-Zellen. Die Gruppe der Methylzellulose wies einen hohen Einstrom von CD14+Monozyten auf im Vergleich zur Testkomponente, die nur vereinzelte Monozyten zeigt. Eine hohe Frequenz an CD4+ und CD8+ T-Zellen ist in der Methylzellulosegruppe zu sehen.

Somit wurde die Hypothese bestätigt, dass der Monozyteninhibitor auch zu einem geringeren Einstrom von inflammatorischen Zellen führt.

## **6.7 Ziel VII: Monozyteninhibitor und Infliximab im Vergleich**

### **6.7.1 Hypothese 7.1: Die Wirkung von dem Monozyteninhibitor und Infliximab ist vergleichbar**

Ziel dieser Studie war die Testung eines Monozyteninhibitors im Mausmodell. Zur Validierung des Modells wurde eine Tiergruppe mit Infliximab behandelt. Infliximab ist ein monoklonaler TNF $\alpha$  Antikörper, der eine etablierte Therapie bei moderater bis schwerer Colitis ulcerosa darstellt (Singh et al., 2020). Ursprünglich wurden die immunsupprimierenden Antikörper bei Transplantationen eingesetzt um die Abstoßungsreaktion zu vermeiden. Eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese der Colitis ulcerosa stellt die Infiltration der Mukosa mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar, einhergehend mit einer erhöhten Sekretion proinflammatorischer Zytokine, unter anderem TNF $\alpha$ , IL17 und IL4 (Feng et al., 2020). Infliximab inhibiert die durch TNF $\alpha$  ausgelöste Inflammation der Mukosa bei *Colitis ulcerosa* Patienten. Dahingegen setzt der Wirkmechanismus der Testkomponente bereits früher, in der Inhibition der Monozyten, an. Monozyten spielen als APC Zellen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen.

Die Wirkung von Infliximab im NSG-UC Modell fiel geringer aus als erwartet, bedingt durch die geringe Ausprägung von Krankheitssymptomen in der Isotyp Kontrollgruppe. Für die geringe Ausprägung einer Kolitis durch die Applikation des Isotyp Antikörpers wurde keine Erklärung gefunden. Vergleicht man die Wirkung der Testkomponente mit Infliximab bezüglich der histologischen Scores, sind nur geringe Unterschiede festzustellen. Die pathologischen Veränderungen beschränken sich auf den Einstrom weniger inflammatorischer Zellen und geringe fibrotische Veränderungen in beiden Gruppen. Dies unterstützt die Annahme das beide Substanzen Effekte auf die klinischen Scores erzielten. Beim Vergleich der Effekte von Infliximab und der Testkomponente auf die Monozyten wird eine stärkere Inflammation in der Infliximab Gruppe deutlich, einhergehend mit einer höheren Frequenz an CD4<sup>+</sup>CD134<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD252<sup>+</sup> Zellen. Beide Zellpopulationen weisen einen OX40 Rezeptor für die Differenzierung und Proliferation von *memory* CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen auf (Jodeleit, Winkelmann, et al., 2020). Die Testkomponente wies verglichen mit Infliximab stärkere inhibitorische Effekte auf die M1 Monozyten (CD14<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup>) auf. Die Annahme, dass die Testkomponente die Monozyten/T-Zellachse unterbricht scheint begründet. Die Frequenz aktivierter T-Zellen, insbesondere die Populationen

CD4+CD134+, CD4+CD25+ und CD4+CD103, war in der Infliximab Gruppe geringer im Vergleich zur Testkomponenten Gruppe. Dies könnte durch eine direkte Inhibition von Infliximab auf die TNF $\alpha$ - induzierte Inflammation begründet sein. Im Vergleich zur Infliximab Gruppe erzielte die Testkomponente stärkere Effekte auf die Inhibition der B-Zellen, mit einer signifikanten Reduzierung in den Populationen CD19+, CD19+CD38+, CD19+CD27+IgD- und CD19+CD27-IgD+.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Inhibition der Monozyten die Achse zu den B- und T-Zellen unterdrückt und zu einer deutlichen Reduktion der Inflammation führt. Ob diese Wirkung mit der Wirkung von Infliximab verglichen werden kann, kann mit diesen Experimenten nicht gesagt werden.



## 7 ZUSAMMENFASSUNG

### *Monozyten als Zielzellen zur Therapie von Colitis ulcerosa*

*Colitis ulcerosa* ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die sich auf das Kolon beschränkt. Die Erkrankung ist geprägt von Phasen der Remission und des Rückfalls. Patienten mit *Colitis ulcerosa*, die oft schon sehr jung erkranken, werden lebenslang medikamentös behandelt. Ihre Lebensqualität ist durch blutige Durchfälle, Bauchkrämpfe sowie extraintestinale Manifestationen stark eingeschränkt. Die Schlüsselrolle in der Pathogenese spielt eine überschießende Immunreaktion des Körpers, die sich in einer pathologischen chronischen Entzündung der Darmschleimhaut manifestiert. Therapeutika greifen an verschiedenen Stellen in das komplexe Gefüge des Immunsystems ein, mit dem Ziel die chronische Entzündung zu unterdrücken. Etabliert ist eine anfängliche Therapie mit Kortikosteroiden, der sich die Behandlung mit Immunsuppressiva wie z.B. Cyclosporine anschließt. In den letzten Jahren haben monoklonale Antikörper die Immunsuppressiva weitgehend verdrängt. Die Patienten sprechen jedoch auf die Therapie mit monoklonalen Antikörpern sehr unterschiedlich an, und vorherige Studien haben gezeigt, dass Infliximab bevorzugt den pro-inflammatorischen Arm der Inflammation unterdrückt. Ziel dieser Studie war die Testung eines neuen therapeutischen Ansatzes, der spezifisch Monozyten adressiert. Für die Testung des Monozyteninhibitors wurden NOD Scid IL2R $\gamma$  Chain<sup>null</sup> Mäuse verwendet, die mit PBMCs von *Colitis ulcerosa* Spendern rekonstituiert wurden. In diesem Modell werden Kolitis Symptome durch die rektale Applikation von 50% Ethanol ausgelöst. Das humanisierte Mausmodell ermöglicht eine teilweise Abbildung des Krankheitsbildes und ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von Medikamenten auf die humanen Immunzellen. Um einen großen Effekt des Monozyteninhibitors zu erreichen wurden für die Studie Spender ausgewählt, deren Immunprofile einen hohen Anteil von Monozyten und TH17-Zellen aufwiesen. Parameter zur Evaluierung des Inhibitors waren der klinische-, Kolon- und histologische Score sowie Frequenzen von Monozyten, aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Zytokinspiegel im Kolon der Mäuse.

Die Kontrollgruppe zeigte nach rektaler Ethanol Applikation das klinische Bild einer milden Kolitis. Die Inflammation konnte durch eine erhöhte Frequenz der M1(CD14+CD64+) und M2 Monozyten (CD14+CD163+CD206+) sowie eine

erhöhte T-Zellaktivierung der Populationen CD4+CD134+, CD4+CD25+ und CD4+CD252+ zusätzlich belegt werden. Im Vergleich zur Kontrolle erzielte die Testkomponente eine deutlich verminderte klinische Aktivität der Kolitis, einhergehend mit einer starken Inhibition der M1 und M2 Monozyten, einer verringerten T-Zellaktivierung und eine verminderte Frequenz der B-Zellen. Zusätzlich waren die Spiegel der Zytokine TGF $\beta$  und IL-17A erniedrigt. Die Annahme, dass die Tiere von der Inhibition der Monozyten profitieren, konnte somit im Mausmodell belegt werden. Die Inhibition der Monozyten konnte vermutlich die Monozyten-T-Zellachse unterbrechen und damit die Reifung der B-Zellen unterdrücken. Um die Wirkung des Monozyteninhibitors mit der von Infliximab zu vergleichen, wurde eine Gruppe mit Infliximab behandelt. Hier diente eine Isotyp behandelte Gruppe als Kontrolle. Aufgrund der geringen Krankheitsaktivität der Isotyp-Kontrollgruppe fielen die Effekte von Infliximab geringer aus. Im Vergleich zur Testkomponente konnte Infliximab die Entzündung jedoch nicht vollständig unterdrücken und wies eine erhöhte Inflammation auf, indiziert durch eine höhere T-Zellaktivierung. Die Studie zeigt, dass Patienten von der Applikation eines Monozyteninhibitors profitieren könnten, und eventuell eine Kombinationstherapie von Infliximab mit einem Monozyteninhibitor zu einer vollständigen Remission führen könnte.

## 8 SUMMARY

### *Monocytes as target cells for treatment of ulcerative colitis*

*Ulcerative colitis* is a chronic disease of the bowel, restricted to the colon. The disease is characterized by phases of acute inflammation and remission. Patients with *ulcerative colitis* are often diagnosed at a young age and require life-long medical treatment. They suffer from bloody diarrhea, abdominal cramps and extraintestinal manifestation, leading to a lower quality of life. An uncontrolled immune reaction of the body is the cause of the pathological chronic inflammation of the intestinal mucosa. The first treatment option are corticosteroids, followed by the application of more powerful immunosuppressive drugs such as cyclosporine. Recently monoclonal antibodies directed against TNF $\alpha$  e.g. infliximab are replacing these therapeutics. Unfortunately, only 40% of the patients respond to the treatment with infliximab. Therefore, the aim of this study was to validate a new treatment option for *ulcerative colitis*. The novel therapeutic inhibits monocytes as drivers of inflammation in UC. For this study, NOD Scid IL2R $\gamma$  Chain<sup>null</sup> mice were reconstituted with PBMCs of UC patients and colitis symptoms were induced by rectal application of 50% ethanol. The humanized mouse model partially reflects the disease symptoms and leads to a better understanding of the interaction between drugs and immune system. To yield a high response to the monocyte inhibitor, UC patients with high levels of monocytes and Th17 cells were chosen for the study. Read out were the clinical-, colon- and histological scores, frequencies of monocytes, activated T-cells, B-cells and levels of colonic cytokines.

The challenged control group showed a mild clinical colitis during experiment upon rectal application of ethanol. High frequencies of M1 monocytes (CD14+CD64+), M2 monocytes (CD14+CD163+CD206+) and a pronounced T-cell activation including the populations of CD4+CD134+, CD4+CD25+ and CD4+CD252+ were detected. Compared to the control group the mice benefitted from the treatment with the monocyte inhibitor as shown by reduced scores and a strong reduction of frequencies of M1, M2 monocytes, activated T-cells and impaired B-cell maturation. In addition, levels of IL-17A and TGF $\beta$  decreased in response to treatment. The efficacy of the novel therapeutic was compared to a group of mice treated with infliximab. This comparison was hampered due to the low clinical activity in the isotype control group that ultimately lead to smaller effects of

---

infliximab. However, infliximab did not eliminate the inflammation and showed higher levels of T-cell activation. This study indicates that both treatments do not completely suppress inflammation. Therefore patients may benefit from a combinatorial therapy with infliximab and a therapeutic addressing monocytes.



## 9 LITERATURVERZEICHNIS

ABOS, B., WANG, T., SECOMBES, C. J., et al. (2020). Distinct modes of action of CD40L and adaptive cytokines IL-2, IL-4/13, IL-10 and IL-21 on rainbow trout IgM(+) B cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 111, 103752. doi:10.1016/j.dci.2020.103752

ABRAHAM, C., & CHO, J. H. (2009). Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*, 361(21), 2066-2078. doi:10.1056/NEJMra0804647

AKIRA, S., & TAKEDA, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews: Immunology*, 4(7), 499-511. doi:10.1038/nri1391

AKMAN, B., HU, X., LIU, X., et al. (2020). PRDM1 decreases sensitivity of human NK cells to IL2-induced cell expansion by directly repressing CD25 (IL2RA). *Journal of Leukocyte Biology*. doi:10.1002/jlb.2a0520-321rr

ALTURKISTANI, H. A., TASHKANDI, F. M., & MOHAMMEDSALEH, Z. M. (2015). Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Glob J Health Sci*, 8(3), 72-79. doi:10.5539/gjhs.v8n3p72

ANDOH, A., IMAEDA, H., AOMATSU, T., et al. (2011). Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Gastroenterology*, 46(4), 479-486. doi:10.1007/s00535-010-0368-4

AUFFRAY, C., FOGG, D., GARFA, M., et al. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, 317(5838), 666-670. doi:10.1126/science.1142883

AYABE, T., SATCHELL, D. P., WILSON, C. L., et al. (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature Immunology*, 1(2), 113-118. doi:10.1038/77783

BAK-ROMANISZYN, L., ŚWIERZKO, A. S., SOKOŁOWSKA, A., et al. (2020). Mannose-binding lectin (MBL) in adult patients with inflammatory bowel disease. *Immunobiology*, 225(1), 151859. doi:10.1016/j.imbio.2019.10.008

BEDNARZ, W., OLEWINSKI, R., WOJCZYS, R., et al. (2005). Ileal-pouch-anal anastomosis after restorative proctocolectomy in patients with ulcerative colitis or familial adenomatous polyposis. *Hepato-Gastroenterology*, 52(64), 1101-1105.

BERNSTEIN, C. N., BLANCHARD, J. F., KLIEWER, E., et al. (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, 91(4), 854-862. doi:10.1002/1097-0142(20010215)91:4<854::aid-cncr1073>3.0.co;2-z

BERNSTEIN, C. N., SHANAHAN, F., & WEINSTEIN, W. M. (1994). Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? *Lancet*, 343(8889), 71-74. doi:10.1016/s0140-6736(94)90813-3

BEVINS, C. L., & SALZMAN, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews: Microbiology*, 9(5), 356-368. doi:10.1038/nrmicro2546

BLOOMFIELD, S. F., STANWELL-SMITH, R., CREVEL, R. W., et al. (2006). Too clean, or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene. *Clinical and Experimental Allergy*, 36(4), 402-425. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02463.x

BONILLA, F. A., & OETTGEN, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S33-40. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.017

BOSMA, G. C., CUSTER, R. P., & BOSMA, M. J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301(5900), 527-530. doi:10.1038/301527a0

BOTH, H., TORP-PEDERSEN, K., KREINER, S., et al. (1983). Clinical appearance at diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease in a regional patient group. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 18(7), 987-991. doi:10.3109/00365528309182127

BURISCH, J., JESS, T., MARTINATO, M., et al. (2013). The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *Journal of Crohn's & Colitis*, 7(4), 322-337. doi:10.1016/j.crohns.2013.01.010

CAO, X., SHORES, E. W., HU-LI, J., et al. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity*, 2(3), 223-238. doi:10.1016/1074-7613(95)90047-0

CHASSAING, B., KOREN, O., GOODRICH, J. K., et al. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 519(7541), 92-96. doi:10.1038/nature14232

CHAUBAL, A., PANDEY, V., CHOKSI, D., et al. (2017). Anemia in patients with ulcerative colitis in remission: A study from western India. *Indian Journal of Gastroenterology*, 36(5), 361-365. doi:10.1007/s12664-017-0791-z

CHEN, F., LIU, Z., WU, W., et al. (2012). An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nature Medicine*, 18(2), 260-266. doi:10.1038/nm.2628

COFFMAN, R. L., SEYMOUR, B. W., HUDAK, S., et al. (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science*, 245(4915), 308-310. doi:10.1126/science.2787531

COHEN, J. L., STRONG, S. A., HYMAN, N. H., et al. (2005). Practice parameters for the surgical treatment of ulcerative colitis. *Diseases of the Colon and Rectum*, 48(11), 1997-2009. doi:10.1007/s10350-005-0180-z

COLE, S., WALSH, A., YIN, X., et al. (2018). Integrative analysis reveals CD38 as a therapeutic target for plasma cell-rich pre-disease and established rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 20(1), 85. doi:10.1186/s13075-018-1578-z

CORGNAC, S., BOUTET, M., KFOURY, M., et al. (2018). The Emerging Role of CD8(+) Tissue Resident Memory T (T(RM)) Cells in Antitumor Immunity: A Unique Functional Contribution of the CD103 Integrin. *Frontiers in Immunology*, 9, 1904. doi:10.3389/fimmu.2018.01904

DANESE, S., & FIOCCHI, C. (2011). Ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine*, 365(18), 1713-1725. doi:10.1056/NEJMra1102942

DIGNASS, A., PREISS, J. C., AUST, D. E., et al. (2011). [Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 49(9), 1276-1341. doi:10.1055/s-0031-1281666

DIXON, L. J., KABI, A., NICKERSON, K. P., et al. (2015). Combinatorial effects of diet and genetics on inflammatory bowel disease pathogenesis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(4), 912-922. doi:10.1097/mib.0000000000000289

DOMINGUEZ-VILLAR, M., & HAFLER, D. A. (2018). Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nature Immunology*, 19(7), 665-673. doi:10.1038/s41590-018-0120-4

DONG, C. (2008). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature Reviews: Immunology*, 8(5), 337-348. doi:10.1038/nri2295

DURANT, L., WATFORD, W. T., RAMOS, H. L., et al. (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*, 32(5), 605-615. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.003

EIBEL, H., KRAUS, H., SIC, H., et al. (2014). B cell biology: an overview. *Current Allergy and Asthma Reports*, 14(5), 434. doi:10.1007/s11882-014-0434-8

EICHELE, D. D., & KHARBANDA, K. K. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 23(33), 6016-6029. doi:10.3748/wjg.v23.i33.6016

EIKAWA, S., OHUE, Y., KITAOKA, K., et al. (2010). Enrichment of Foxp3+ CD4 regulatory T cells in migrated T cells to IL-6- and IL-8-expressing tumors through predominant induction of CXCR1 by IL-6. *Journal of Immunology*, 185(11), 6734-6740. doi:10.4049/jimmunol.1000225

FASCHING, P., STRADNER, M., GRANINGER, W., et al. (2017). Therapeutic Potential of Targeting the Th17/Treg Axis in Autoimmune Disorders. *Molecules*, 22(1). doi:10.3390/molecules22010134

FENG, B. S., MA, N., ZHANG, Y. Y., et al. (2020). Survivin Impairs the Apoptotic Machinery in CD4+ T Cells of Patients with Ulcerative Colitis. *Journal of Innate Immunity*, 12(3), 226-234. doi:10.1159/000500546

FERRANTE, M., DECLERCK, S., DE HERTOOGH, G., et al. (2008). Outcome after proctocolectomy with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(1), 20-28. doi:10.1002/ibd.20278

FEUERSTEIN, J. D., ISAACS, K. L., SCHNEIDER, Y., et al. (2020). AGA Clinical Practice Guidelines on the Management of Moderate to Severe Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, 158(5), 1450-1461. doi:10.1053/j.gastro.2020.01.006

FEUERSTEIN, J. D., MOSS, A. C., & FARRAYE, F. A. (2019). Ulcerative Colitis. *Mayo Clinic Proceedings*, 94(7), 1357-1373. doi:10.1016/j.mayocp.2019.01.018

FEUERSTEIN, J. D., NGUYEN, G. C., KUPFER, S. S., et al. (2017). American

Gastroenterological Association Institute Guideline on Therapeutic Drug Monitoring in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 153(3), 827-834. doi:10.1053/j.gastro.2017.07.032

FIOCCHI, C., & LUND, P. K. (2011). Themes in fibrosis and gastrointestinal inflammation. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(5), G677-683. doi:10.1152/ajpgi.00104.2011

FISHER, S. A., TREMELLING, M., ANDERSON, C. A., et al. (2008). Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nature Genetics*, 40(6), 710-712. doi:10.1038/ng.145

FISTONICH, C., ZEHENTMEIER, S., BEDNARSKI, J. J., et al. (2018). Cell circuits between B cell progenitors and IL-7(+) mesenchymal progenitor cells control B cell development. *Journal of Experimental Medicine*, 215(10), 2586-2599. doi:10.1084/jem.20180778

FLANAGAN, S. P. (1966). 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genetical Research*, 8(3), 295-309. doi:10.1017/s0016672300010168

FRANK, D. N., ST AMAND, A. L., FELDMAN, R. A., et al. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), 13780-13785. doi:10.1073/pnas.0706625104

FUMERY, M., SINGH, S., DULAI, P. S., et al. (2018). Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-based Cohorts: A Systematic Review. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(3), 343-356.e343. doi:10.1016/j.cgh.2017.06.016

GHORESCHI, K., JESSON, M. I., LI, X., et al. (2011). Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib (CP-690,550). *Journal of Immunology*, 186(7), 4234-4243. doi:10.4049/jimmunol.1003668

GIBBONS, R. M., LIU, X., HARRINGTON, S. M., et al. (2014). B7-H1 signaling is integrated during CD8(+) T cell priming and restrains effector differentiation. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(8), 859-867. doi:10.1007/s00262-014-1563-6

GLASSNER, K. L., ABRAHAM, B. P., & QUIGLEY, E. M. M. (2020). The microbiome and inflammatory bowel disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(1), 16-27. doi:10.1016/j.jaci.2019.11.003

GOLDNER, J. (1938). A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *American Journal of Pathology*, 14(2), 237-243.

GORDON, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews: Immunology*, 3(1), 23-35. doi:10.1038/nri978

GRADEL, K. O., NIELSEN, H. L., SCHØNHEYDER, H. C., et al. (2009). Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology*, 137(2), 495-501. doi:10.1053/j.gastro.2009.04.001

GREINER, D. L., SHULTZ, L. D., YATES, J., et al. (1995). Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice. *American Journal of Pathology*, 146(4), 888-902.

GUILLIAMS, M., MILDNER, A., & YONA, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*, 49(4), 595-613. doi:10.1016/j.immuni.2018.10.005

HERNÁNDEZ-PÉREZ, S., VAINIO, M., KUOKKANEN, E., et al. (2019). B cells rapidly target antigen and surface-derived MHCII into peripheral degradative compartments. *Journal of Cell Science*, 133(5). doi:10.1242/jcs.235192

HIRAHARA, K., & NAKAYAMA, T. (2016). CD4+ T-cell subsets in

inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *International Immunology*, 28(4), 163-171. doi:10.1093/intimm/dxw006

IKEZUMI, Y., SUZUKI, T., KARASAWA, T., et al. (2011). Identification of alternatively activated macrophages in new-onset paediatric and adult immunoglobulin A nephropathy: potential role in mesangial matrix expansion. *Histopathology*, 58(2), 198-210. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.03742.x

ITO, M., HIRAMATSU, H., KOBAYASHI, K., et al. (2002). NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100(9), 3175-3182. doi:10.1182/blood-2001-12-0207

JAKUBZICK, C., KUNKEL, S. L., PURI, R. K., et al. (2004). Therapeutic targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells in pulmonary fibrosis. *Immunologic Research*, 30(3), 339-349. doi:10.1385/ir:30:3:339

JAKUBZICK, C. V., RANDOLPH, G. J., & HENSON, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews: Immunology*, 17(6), 349-362. doi:10.1038/nri.2017.28

JANEWAY, C. A., Jr., & MEDZHITOV, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, 197-216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359

JINNO, Y., OHTANI, H., NAKAMURA, S., et al. (2006). Infiltration of CD19+ plasma cells with frequent labeling of Ki-67 in corticosteroid-resistant active ulcerative colitis. *Virchows Archiv*, 448(4), 412-421. doi:10.1007/s00428-005-0136-7

JODELEIT, H., CAESAR, J., VILLARROEL AGUILERA, C., et al. (2019). The Combination of Patient Profiling and Preclinical Studies in a Mouse Model Based on NOD/Scid IL2R $\gamma$ null Mice Reconstituted With Peripheral Blood Mononuclear Cells From Patients With Ulcerative Colitis May Lead to Stratification of Patients



for Treatment With Adalimumab. *Inflammatory Bowel Diseases*, 26(4), 557-569. doi:10.1093/ibd/izz284

JODELEIT, H., MILCHRAM, L., SOLDI, R., et al. (2020). Autoantibodies as diagnostic markers and potential drivers of inflammation in ulcerative colitis. *PLoS One*, 15(2), e0228615. doi:10.1371/journal.pone.0228615

JODELEIT, H., PALAMIDES, P., BEIGEL, F., et al. (2017). Design and validation of a disease network of inflammatory processes in the NSG-UC mouse model. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 265. doi:10.1186/s12967-017-1368-4

JODELEIT, H., WINKELMANN, P., CAESAR, J., et al. (2020). Head to head study of oxelumab and adalimumab in a mouse model of ulcerative colitis based on NOD/Scid IL-2R $\gamma$ (null) mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells. *Disease Models & Mechanisms*, 14(1). doi:10.1242/dmm.046995

JOHANSSON, M. E., GUSTAFSSON, J. K., HOLMÉN-LARSSON, J., et al. (2014). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*, 63(2), 281-291. doi:10.1136/gutjnl-2012-303207

JOHANSSON, M. E., & HANSSON, G. C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews: Immunology*, 16(10), 639-649. doi:10.1038/nri.2016.88

JOLLIFFE, I. T., & CADIMA, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 374(2065), 20150202. doi:10.1098/rsta.2015.0202

JOSEFOWICZ, S. Z., LU, L. F., & RUDENSKY, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology*, 30, 531-564. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623

KANAMORI, M., NAKATSUKASA, H., OKADA, M., et al. (2016). Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends in Immunology*, 37(11), 803-811. doi:10.1016/j.it.2016.08.012

KAPLAN, M. H., SCHINDLER, U., SMILEY, S. T., et al. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, 4(3), 313-319. doi:10.1016/s1074-7613(00)80439-2

KAUR, A., & GOGGOLIDOU, P. (2020). Ulcerative colitis: understanding its cellular pathology could provide insights into novel therapies. *J Inflamm (Lond)*, 17, 15. doi:10.1186/s12950-020-00246-4

KAWAI, T., & AKIRA, S. (2007). TLR signaling. *Seminars in Immunology*, 19(1), 24-32. doi:10.1016/j.smim.2006.12.004

KIESLER, P., FUSS, I. J., & STROBER, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 1(2), 154-170. doi:10.1016/j.jcmgh.2015.01.006

KIM, Y. S., & HO, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, 12(5), 319-330. doi:10.1007/s11894-010-0131-2

KIRMAN, J. R., QUINN, K. M., & SEDER, R. A. (2019). Immunological memory. *Immunology and Cell Biology*, 97(7), 615-616. doi:10.1111/imcb.12280

KO, C. W., SINGH, S., FEUERSTEIN, J. D., et al. (2019). AGA Clinical Practice Guidelines on the Management of Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, 156(3), 748-764. doi:10.1053/j.gastro.2018.12.009

KORDJAZY, N., HAJ-MIRZAIAN, A., HAJ-MIRZAIAN, A., et al. (2018). Role of toll-like receptors in inflammatory bowel disease. *Pharmacological Research*, 129, 204-215. doi:10.1016/j.phrs.2017.11.017

KUCHARZIK, T., DIGNASS, A., ATREYA, R., et al. (2018). [Updated S3-Guideline Colitis ulcerosa. German Society for Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) - AWMF Registry 021/009]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 56(9), 1087-1169. doi:10.1055/a-0651-8174

KULKARNI, N., PATHAK, M., & LAL, G. (2017). Role of chemokine receptors and intestinal epithelial cells in the mucosal inflammation and tolerance. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(2), 377-394. doi:10.1189/jlb.1RU0716-327R

LAMB, C. A., KENNEDY, N. A., RAINE, T., et al. (2019). British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 68(Suppl 3), s1-s106. doi:10.1136/gutjnl-2019-318484

LEDDER, O., & TURNER, D. (2018). Antibiotics in IBD: Still a Role in the Biological Era? *Inflammatory Bowel Diseases*, 24(8), 1676-1688. doi:10.1093/ibd/izy067

LEE, Y., AWASTHI, A., YOSEF, N., et al. (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature Immunology*, 13(10), 991-999. doi:10.1038/ni.2416

LEITER, E. H. (1993). The NOD mouse: a model for analyzing the interplay between heredity and environment in development of autoimmune disease. *ILAR Journal*, 35(1), 4-14.

LIN, X. H., WANG, H. C., LI, Y. Y., et al. (2019). IgG plasma cells initiate changes in the protein C system in mouse ulcerative colitis through CD14+CD64+ macrophage activation. *Adv Clin Exp Med*, 28(8), 1101-1110. doi:10.17219/acem/94160

LIU, J. Z., VAN SOMMEREN, S., HUANG, H., et al. (2015). Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nature Genetics*, 47(9), 979-986. doi:10.1038/ng.3359

LUO, A., LEACH, S. T., BARRES, R., et al. (2017). The Microbiota and Epigenetic Regulation of T Helper 17/Regulatory T Cells: In Search of a Balanced Immune System. *Frontiers in Immunology*, 8, 417. doi:10.3389/fimmu.2017.00417

MAGRO, F., GIONCHETTI, P., ELIAKIM, R., et al. (2017). Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *Journal of Crohn's & Colitis*, 11(6), 649-670. doi:10.1093/ecco-jcc/jjx008

MAGRO, F., LANGNER, C., DRIESSEN, A., et al. (2013). European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & Colitis*, 7(10), 827-851. doi:10.1016/j.crohns.2013.06.001

MAK, W. Y., ZHAO, M., NG, S. C., et al. (2020). The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 35(3), 380-389. doi:10.1111/jgh.14872

MARSH, S. A., ARTHUR, H. M., & SPYRIDOPOULOS, I. (2017). The secret life of nonclassical monocytes. *Cytometry A*, 91(11), 1055-1058. doi:10.1002/cyto.a.23280

MAYER, L., SANDBORN, W. J., STEPANOV, Y., et al. (2014). Anti-IP-10 antibody (BMS-936557) for ulcerative colitis: a phase II randomised study. *Gut*, 63(3), 442-450. doi:10.1136/gutjnl-2012-303424

MEYLAN, E., TSCHOPP, J., & KARIN, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, 442(7098), 39-44. doi:10.1038/nature04946

MILLS, C. D., KINCAID, K., ALT, J. M., et al. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology*, 164(12), 6166-6173. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166

MINDEMARK, M., & LARSSON, A. (2012). Ruling out IBD: estimation of the possible economic effects of pre-endoscopic screening with F-calprotectin. *Clinical Biochemistry*, 45(7-8), 552-555. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.10.015

MIURA, S., IMAEDA, H., SHIOZAKI, H., et al. (1993). Increased proliferative response of lymphocytes from intestinal lymph during long chain fatty acid absorption. *Immunology*, 78(1), 142-146.

MIZOGUCHI, E., LOW, D., EZAKI, Y., et al. (2020). Recent updates on the basic mechanisms and pathogenesis of inflammatory bowel diseases in experimental animal models. *Intest Res*, 18(2), 151-167. doi:10.5217/ir.2019.09154

MOHAMMED, N., & SUBRAMANIAN, V. (2016). Clinical relevance of endoscopic assessment of inflammation in ulcerative colitis: Can endoscopic evaluation predict outcomes? *World Journal of Gastroenterology*, 22(42), 9324-9332. doi:10.3748/wjg.v22.i42.9324

NEURATH, M. F., FUSS, I., KELSALL, B. L., et al. (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 182(5), 1281-1290. doi:10.1084/jem.182.5.1281

O'GARRA, A., VIEIRA, P. L., VIEIRA, P., et al. (2004). IL-10-producing and naturally occurring CD4<sup>+</sup> Tregs: limiting collateral damage. *Journal of Clinical Investigation*, 114(10), 1372-1378. doi:10.1172/jci23215

ORECCHIONI, M., GHOSHEH, Y., PRAMOD, A. B., et al. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10, 1084. doi:10.3389/fimmu.2019.01084

OWEN, D. L., SJAASTAD, L. E., & FARRAR, M. A. (2019). Regulatory T Cell Development in the Thymus. *Journal of Immunology*, 203(8), 2031-2041. doi:10.4049/jimmunol.1900662

PALAMIDES, P., JODELEIT, H., FOHLINGER, M., et al. (2016). A mouse model for ulcerative colitis based on NOD-scid IL2R gammanull mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from affected individuals. *Disease Models & Mechanisms*, 9(9), 985-997. doi:10.1242/dmm.025452

PARIKH, K., ANTANAVICIUTE, A., FAWKNER-CORBETT, D., et al. (2019). Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature*, 567(7746), 49-55. doi:10.1038/s41586-019-0992-y

PARKES, G. C., WHELAN, K., & LINDSAY, J. O. (2014). Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *Journal of Crohn's & Colitis*, 8(8), 717-725. doi:10.1016/j.crohns.2014.02.002

PARKS, A. G., & NICHOLLS, R. J. (1978). Proctocolectomy without ileostomy for ulcerative colitis. *British Medical Journal*, 2(6130), 85-88. doi:10.1136/bmj.2.6130.85

PATEL, A. A., ZHANG, Y., FULLERTON, J. N., et al. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 214(7), 1913-1923. doi:10.1084/jem.20170355

PEMBERTON, J. H., KELLY, K. A., BEART, R. W., Jr., et al. (1987). Ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. Long-term results. *Annals of Surgery*, 206(4), 504-513. doi:10.1097/00000658-198710000-00011

PEPPER, M., & JENKINS, M. K. (2011). Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nature Immunology*, 12(6), 467-471. doi:10.1038/ni.2038

PEYRIN-BIROULET, L., PANÉS, J., SANDBORN, W. J., et al. (2016). Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14(3), 348-354.e317. doi:10.1016/j.cgh.2015.06.001

PINETON DE CHAMBRUN, G., TASSY, B., KOLLEN, L., et al. (2018). The treatment of refractory ulcerative colitis. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology*, 32-33, 49-57. doi:10.1016/j.bpg.2018.05.009

POULLIS, A., FOSTER, R., NORTHFIELD, T. C., et al. (2002). Review article: faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16(4), 675-681. doi:10.1046/j.1365-2036.2002.01196.x

PRITCHARD, G. H., KEDL, R. M., & HUNTER, C. A. (2019). The evolving role of T-bet in resistance to infection. *Nature Reviews: Immunology*, 19(6), 398-410. doi:10.1038/s41577-019-0145-4

RAFFIN, C., VO, L. T., & BLUESTONE, J. A. (2020). T(reg) cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nature Reviews: Immunology*, 20(3), 158-172. doi:10.1038/s41577-019-0232-6

RAJEWSKY, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381(6585), 751-758. doi:10.1038/381751a0

RAO, S. S., HOLDSWORTH, C. D., & READ, N. W. (1988). Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut*, 29(3), 342-345. doi:10.1136/gut.29.3.342

REDMOND, W. L., RUBY, C. E., & WEINBERG, A. D. (2009). The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. *Critical Reviews in Immunology*, 29(3), 187-201. doi:10.1615/critrevimmunol.v29.i3.10

RODGERS, A. D., & CUMMINS, A. G. (2007). CRP correlates with clinical score in ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(9), 2063-2068. doi:10.1007/s10620-006-9691-2

SÁNCHEZ-MUÑOZ, F., FONSECA-CAMARILLO, G., VILLEDA-RAMÍREZ,

M. A., et al. (2011). Transcript levels of Toll-Like Receptors 5, 8 and 9 correlate with inflammatory activity in Ulcerative Colitis. *BMC Gastroenterology*, 11(1), 138.

SANDBORN, W. J., BOSWORTH, B., ZAKKO, S., et al. (2015). Budesonide foam induces remission in patients with mild to moderate ulcerative proctitis and ulcerative proctosigmoiditis. *Gastroenterology*, 148(4), 740-750.e742. doi:10.1053/j.gastro.2015.01.037

SANDBORN, W. J., & HANAUER, S. B. (2003). Systematic review: the pharmacokinetic profiles of oral mesalazine formulations and mesalazine pro-drugs used in the management of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 17(1), 29-42. doi:10.1046/j.1365-2036.2003.01408.x

SANDERS, D. S. (1998). The differential diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Bailliere's Clinical Gastroenterology*, 12(1), 19-33. doi:10.1016/s0950-3528(98)90084-7

SANSONETTI, P. J. (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews: Immunology*, 4(12), 953-964. doi:10.1038/nri1499

SATSANGI, J., SILVERBERG, M. S., VERMEIRE, S., et al. (2006). The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55(6), 749-753. doi:10.1136/gut.2005.082909

SAYAR, S., KURBUZ, K., KAHRAMAN, R., et al. (2020). A practical marker to determining acute severe ulcerative colitis: CRP/albumin ratio. *North Clin Istanb*, 7(1), 49-55. doi:10.14744/nci.2018.78800

SCHAUBECK, M., CLAVEL, T., CALASAN, J., et al. (2016). Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut*, 65(2), 225-237. doi:10.1136/gutjnl-2015-309333



SCHOBER, P., BOER, C., & SCHWARTE, L. A. (2018). Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia and Analgesia*, 126(5), 1763-1768. doi:10.1213/ane.0000000000002864

SCHROEDER, K. W., TREMAINE, W. J., & ILSTRUP, D. M. (1987). Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine*, 317(26), 1625-1629.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A., MOHAMMADIAN, S., VAZINI, H., et al. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429

SHIH, D. Q., & TARGAN, S. R. (2008). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14(3), 390-400. doi:10.3748/wjg.14.390

SHIVANANDA, S., LENNARD-JONES, J., LOGAN, R., et al. (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*, 39(5), 690-697. doi:10.1136/gut.39.5.690

SHOSTAK, S. (2013). Histology's nomenclature: Past, present and future. *Biol Syst Open Access*, 2(122), 2.

SHOUSE, G., & NIKOLAENKO, L. (2019). Targeting the JAK/STAT Pathway in T Cell Lymphoproliferative Disorders. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 14(6), 570-576. doi:10.1007/s11899-019-00545-5

SILVERBERG, M. S., SATSANGI, J., AHMAD, T., et al. (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 19 Suppl A, 5a-36a. doi:10.1155/2005/269076

SINGH, S., ALLEGRETTI, J. R., SIDDIQUE, S. M., et al. (2020). AGA Technical Review on the Management of Moderate to Severe Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, 158(5), 1465-1496.e1417. doi:10.1053/j.gastro.2020.01.007

SOLBERG, I. C., LYGREN, I., JAHNSEN, J., et al. (2009). Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 44(4), 431-440. doi:10.1080/00365520802600961

SPICELAND, C. M., & LODHIA, N. (2018). Endoscopy in inflammatory bowel disease: Role in diagnosis, management, and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 24(35), 4014-4020. doi:10.3748/wjg.v24.i35.4014

STANGE, E. F., & SCHROEDER, B. O. (2019). Microbiota and mucosal defense in IBD: an update. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 13(10), 963-976. doi:10.1080/17474124.2019.1671822

STARK, J. M., TIBBITT, C. A., & COQUET, J. M. (2019). The Metabolic Requirements of Th2 Cell Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 10, 2318. doi:10.3389/fimmu.2019.02318

SWIECKI, M., & COLONNA, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature Reviews: Immunology*, 15(8), 471-485. doi:10.1038/nri3865

TANG, P. M., NIKOLIC-PATERSON, D. J., & LAN, H. Y. (2019). Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol*, 15(3), 144-158. doi:10.1038/s41581-019-0110-2

TRUELOVE, S. C., WATKINSON, G., & DRAPER, G. (1962). Comparison of corticosteroid and sulphasalazine therapy in ulcerative colitis. *British Medical Journal*, 2(5321), 1708-1711. doi:10.1136/bmj.2.5321.1708

TRUELOVE, S. C., & WITTS, L. J. (1955). Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *British Medical Journal*, 2(4947), 1041-1048. doi:10.1136/bmj.2.4947.1041

TSIANOS, V. E., KOSTOULAS, C., GAZOULI, M., et al. (2020). ATG16L1 T300A polymorphism is associated with Crohn's disease in a Northwest Greek cohort, but ECM1 T130M and G290S polymorphisms are not associated with ulcerative colitis. *Ann Gastroenterol*, 33(1), 38-44. doi:10.20524/aog.2019.0434

UENO, A., JEFFERY, L., KOBAYASHI, T., et al. (2018). Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease. *Journal of Autoimmunity*, 87, 38-49. doi:10.1016/j.jaut.2017.12.004

UNGARO, R., MEHANDRU, S., ALLEN, P. B., et al. (2017). Ulcerative colitis. *Lancet*, 389(10080), 1756-1770. doi:10.1016/s0140-6736(16)32126-2

VAITAITIS, G. M., WAID, D. M., YUSSMAN, M. G., et al. (2017). CD40-mediated signalling influences trafficking, T-cell receptor expression, and T-cell pathogenesis, in the NOD model of type 1 diabetes. *Immunology*, 152(2), 243-254. doi:10.1111/imm.12761

VAN ASSCHE, G., SANDBORN, W. J., FEAGAN, B. G., et al. (2006). Daclizumab, a humanised monoclonal antibody to the interleukin 2 receptor (CD25), for the treatment of moderately to severely active ulcerative colitis: a randomised, double blind, placebo controlled, dose ranging trial. *Gut*, 55(11), 1568-1574. doi:10.1136/gut.2005.089854

VAN DER POST, S., JABBAR, K. S., BIRCHENOUGH, G., et al. (2019). Structural weakening of the colonic mucus barrier is an early event in ulcerative colitis pathogenesis. *Gut*, 68(12), 2142-2151. doi:10.1136/gutjnl-2018-317571

VAN FURTH, R., COHN, Z. A., HIRSCH, J. G., et al. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 46(6), 845-852.

VAVRICKA, S. R., ROGLER, G., GANTENBEIN, C., et al. (2015). Chronological Order of Appearance of Extraintestinal Manifestations Relative to the Time of IBD Diagnosis in the Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(8), 1794-1800. doi:10.1097/mib.0000000000000429

WALSH, N. C., KENNEY, L. L., JANGALWE, S., et al. (2017). Humanized Mouse Models of Clinical Disease. *Annual Review of Pathology*, 12, 187-215. doi:10.1146/annurev-pathol-052016-100332

WATANABE, S., YAMADA, Y., & MURAKAMI, H. (2020). Expression of Th1/Th2 cell-related chemokine receptors on CD4(+) lymphocytes under physiological conditions. *International Journal of Laboratory Hematology*, 42(1), 68-76. doi:10.1111/ijlh.13141

WEBB, G. J., HIRSCHFIELD, G. M., & LANE, P. J. (2016). OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 50(3), 312-332. doi:10.1007/s12016-015-8498-3

WIRTZ, S., NEUFERT, C., WEIGMANN, B., et al. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols*, 2(3), 541-546. doi:10.1038/nprot.2007.41

XAVIER, R. J., & PODOLSKY, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434. doi:10.1038/nature06005

YASHIRO, M. (2014). Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(44), 16389-16397. doi:10.3748/wjg.v20.i44.16389

YASUDA-ONozAWA, Y., HANDA, O., NAITO, Y., et al. (2017). Rebamipide upregulates mucin secretion of intestinal goblet cells via Akt phosphorylation. *Mol Med Rep*, 16(6), 8216-8222. doi:10.3892/mmr.2017.7647

YE, B. D., & MCGOVERN, D. P. (2016). Genetic variation in IBD: progress, clues to pathogenesis and possible clinical utility. *Expert Review of Clinical Immunology*, 12(10), 1091-1107. doi:10.1080/1744666x.2016.1184972

ZASLOFF, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389-395. doi:10.1038/415389a

ZHAO, Y., ZOU, W., DU, J., et al. (2018). The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation. *Journal of Cellular Physiology*, 233(10), 6425-6439. doi:10.1002/jcp.26461

ZHU, X. M., SHI, Y. Z., CHENG, M., et al. (2017). Serum IL-6, IL-23 profile and Treg/Th17 peripheral cell populations in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Pharmazie*, 72(5), 283-287. doi:10.1691/ph.2017.6957

ZOU, X., SUN, G., HUO, F., et al. (2018). The Role of Dendritic Cells in the Differentiation of T Follicular Helper Cells. *J Immunol Res*, 2018, 7281453. doi:10.1155/2018/7281453



## 10 ANHANG

Tabelle 12: Statistische Auswertung der PBMCs aus den Gruppen Gesund, Spender A und Spender B

Marker	Gesund			A			B			p-Wert
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	
CD14+	6,9	3,22	8	1,79	N/A	1	4,5	N/A	1	
CD14+CD206+	14,58	11,93	8	33	N/A	1	10,4	N/A	1	
CD14+CCR2+	52,41	29,99	8	12,1	N/A	1	99,1	N/A	1	
CD14+CD64+	70,44	20,43	8	76,7	N/A	1	93,7	N/A	1	
CD14+CD163+CD206+	25,61	12,82	8	47,5	N/A	1	27,9	N/A	1	
CD14+CD16+	4,42	9,66	8	5,46	N/A	1	1,66	N/A	1	
CD16+	3,27	1,75	8	5,27	N/A	1	6,61	N/A	1	
CD14+	13,01	12,79	8	15,8	N/A	1	16,2	N/A	1	
CD14+CD1a+	14,7	14,12	8	18,9	N/A	1	82	N/A	1	
CD14+CD80+	60,8	26,9	8	63,9	N/A	1	88,4	N/A	1	
CD14+TSLPR+	12,58	26,1	8	15,7	N/A	1	1,19	N/A	1	
CD14+CD252+	34,64	30,6	8	86,6	N/A	1	83,4	N/A	1	
CD4+	12,41	9,14	8	27,9	N/A	1	9,08	N/A	1	
CD4+CCR4+	13,06	9,2	8	13,6	N/A	1	25,5	N/A	1	
TH2+	17,78	19,88	8	35,1	N/A	1	2,52	N/A	1	
TH17+	46,72	37,62	8	50,8	N/A	1	91,9	N/A	1	
CD4+CCR4+CCR6+	13,71	13,16	8	26,1	N/A	1	17,6	N/A	1	
TH22+	43,85	23,7	8	43	N/A	1	89,2	N/A	1	
CD4+CXCR3+	10,91	4,44	8	14,8	N/A	1	0,91	N/A	1	
TH1+	26,99	26,79	8	35,1	N/A	1	2,94	N/A	1	
TH17+TH1+	49,98	32,13	8	51,9	N/A	1	91,2	N/A	1	
CD8+	4,74	3,42	8	5,06	N/A	1	0,6	N/A	1	

Tabelle 13: Mittelwerte, Standardabweichung und p-Werte der Scores

<i>Behandlung</i>	<i>Histologischer Score</i>			<i>Klinischer Score</i>			<i>Makroskopischer Kolon Score</i>		
	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>
<i>Methylzellulose</i>	7,42	5,02	12	1,58	2,23	12	3,5	1,93	12
<i>Testkomponente</i>	4,25	2,22	12	0,75	1,06	12	2,58	1	12
<i>Isotyp Antikörper</i>	5,17	1,59	12	0,25	0,87	12	4,42	1,38	12
<i>Infliximab</i>	3,1	1,97	10	0,5	0,71	10	3,3	1,06	10

Tabelle 14: Statistische Auswertung des histologischen und makroskopischen Kolon Scores

<i>Histologischer Score</i>	<i>Differenz</i>	<i>95% Konfidenz Intervall</i>		
		<i>unteres</i>	<i>oberes</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Isotyp Antikörper-Infliximab</i>	2,07	-1,44	5,57	0,403
<i>Methylzellulose-Infliximab</i>	4,32	0,81	7,82	0,010
<i>Testkomponente-Infliximab</i>	1,15	-2,36	4,66	0,817
<i>Methylzellulose-Isotyp Antikörper</i>	2,25	-1,09	5,59	0,288
<i>Testkomponente-Isotyp Antikörper</i>	-0,92	-4,26	2,43	0,883
<i>Testkomponente-Methylzellulose</i>	-3,17	-6,51	0,18	0,069
<i>Makroskopischer Kolon Score</i>	<i>Differenz</i>	<i>95% Konfidenz Intervall</i>		
		<i>unteres</i>	<i>oberes</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Isotyp Antikörper-Infliximab</i>	1,12	-0,49	2,73	0,262
<i>Methylzellulose-Infliximab</i>	0,20	-1,41	1,81	0,987
<i>Testkomponente-Infliximab</i>	-0,72	-2,33	0,89	0,636
<i>Methylzellulose-Isotyp Antikörper</i>	-0,92	-2,45	0,62	0,391
<i>Testkomponente-Isotyp Antikörper</i>	-1,83	-3,37	-0,30	0,014
<i>Testkomponente-Methylzellulose</i>	-0,92	-2,45	0,62	0,391



Tabelle 15: Statistische Auswertung des klinischen Scores

<i>Klinischer Score</i>	<i>Bonferroni-<math>\alpha</math>-Adjustierung</i>		
	<i>Z-Wert</i>	<i>p-Wert unadjustiert</i>	<i>p-Wert adjustiert</i>
<i>Infliximab - Isotyp Antikörper</i>	1,12	0,262	1,000
<i>Infliximab - Methylzellulose</i>	-1,47	0,141	0,847
<i>Isotyp Antikörper - Methylzellulose</i>	-2,72	0,007	0,039
<i>Infliximab - Testkomponente</i>	-0,34	0,737	1,000
<i>Isotyp Antikörper - Testkomponente</i>	-1,53	0,126	0,757
<i>Methylzellulose - Testkomponente</i>	1,19	0,234	1,000

Tabelle 16: Statistische Auswertung der Milz FACS Analyse aus den Versuchen mit Spender A und B

Oberflächenmarker	Methylzellulose (MZ)			Testkomponente (MZ+TS)			Isotyp Antikörper (Iso.)			Infliximab (Inflx.)		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
hCD45+	10,99	1,58	6	11,87	2,95	6	6,94	1,06	6	8,73	1,62	5
mCD45+	7,95	3,36	6	10,9	1,26	6	13,65	2,01	6	14,1	2,8	5
CD14+CD1a+	49,85	8,91	6	43,62	7,29	6	34,35	15,64	5	46,2	4,15	5
CD14+CD252+	29,92	5,37	6	23,22	6,61	6	24,86	8,55	5	33,18	5,08	5
CD14+TSLPR+	21,48	3,69	6	19,07	8,63	6	17,74	3,01	5	18	1,87	5
CD14+CD163+	83,58	8,57	6	80,4	3,97	6	73,2	11,09	5	79,5	8,89	5
CD14+CD206+	33,55	13,79	6	23,28	4,67	6	42,98	13,79	5	23,46	9,45	5
CD14+CD64+	77,3	2,6	6	72,95	1,49	6	74,2	2,14	5	73,08	1,66	5
CD14+CD163+CD206+	28,62	4,45	6	24,28	4,16	6	28,7	2,85	5	22,64	3,65	5
CD4+CD69+	26,6	6,13	6	24,88	3,1	6	25,06	8,63	5	28,14	3,62	5
CD4+CD103+	22,52	3,95	6	18,45	1,82	6	20,66	4,57	5	21,56	1,54	5
CD4+CD134+	25,12	4,71	6	7,9	2,52	6	17,89	8,40	5	9,84	3,87	5
CD4+CD25+	57,05	4,65	6	42,53	1,66	6	52,58	5,89	5	48,82	1,66	5
CD25+CD127low	0,27	0,05	6	0,3	0,06	6	0,29	0,11	5	1,35	2,28	6
CD4+CD252+	52,6	15,51	6	57,33	7,23	6	31,54	9,1	5	66,78	3,96	5
CD19+	64,77	8,25	6	56,08	2,95	6	64,18	4,63	5	50,9	1,90	5
CD19+CD38+	27,84	17,42	6	7,99	3,76	6	24,18	8,66	5	6,4	1,94	5
CD19+CD38+CD252+	74,83	3,35	6	76,6	6,3	6	54,24	9,88	5	88,94	4,43	5
CD19+CD252+	67,1	6,61	6	59,13	2,54	6	47,48	6,11	5	64,9	1,85	5
CD19+CD27-IgD+	65,72	2,2	6	50,85	5,79	6	49,08	11,26	5	61,56	4,36	5
CD1+CD27-IgD-	32,2	2,08	6	46,88	5,80	6	48,48	10,96	5	36,56	4,25	5
CD19+CD27+IgD+	59,5	2,96	6	66,68	4,36	6	66,16	5,31	5	72,74	3,54	5
CD19+CD27+IgD-	40,2	3	6	30,97	5,1	6	32,54	6,13	5	21,60	5,18	5

Tabelle 17: *P-Werte der Milz FACS Auswertung*

Abkürzungen: MZ=Methylzellulose, MZ+TS=Testkomponente, Infl.=Infliximab, Iso.=Isotyp Antikörper

<i>Oberflächenmarker</i>	<i>p-Wert</i>
<b>hCD45+</b>	MZ-Iso=0,010    MZ+TS-Iso=0,002
<b>mCD45+</b>	MZ-Inflx=0,003    MZ-Iso=0,004
<b>CD14+CD1a+</b>	
<b>CD14+CD252+</b>	
<b>CD14+TSLPR+</b>	
<b>CD14+CD163+</b>	
<b>CD14+CD206+</b>	Iso-Inflx=0,052    MZ+TS-Iso=0,038
<b>CD14+CD64+</b>	MZ-Inflx=0,014    MZ+TS-MZ=0,008
<b>CD14+CD163+CD206+</b>	
<b>CD4+CD69+</b>	
<b>CD4+CD103+</b>	
<b>CD4+CD134+</b>	MZ-Inflx=0,0007    MZ+TS-Iso=0,024    MZ+TS-MZ=0,0001
<b>CD4+CD25+</b>	MZ-Inflx=0,013    MZ+TS-Iso=0,002    MZ+TS-MZ=0,00002
<b>CD25+CD127low</b>	
<b>CD4+CD252+</b>	Iso-Inflx=0,0002    MZ-Iso=0,015    MZ+TS-Iso=0,003
<b>CD19+</b>	Iso-Inflx=0,004    MZ-Inflx=0,002    MZ+TS-MZ=0,043
<b>CD19+CD38+</b>	MZ-Inflx=0,014    MZ+TS-MZ=0,017
<b>CD19+CD38+CD252+</b>	Iso-Inflx=0,0000004    MZ-Inflx=0,009    MZ+TS-Inflx=0,023    MZ-Iso=0,0002    MZ+TS-Iso=0,00009
<b>CD19+CD252+</b>	Iso-Inflx=0,0001    MZ-Iso=0,00001    MZ+TS-Iso=0,004    MZ+TS-MZ=0,045
<b>CD19+CD27-IgD+</b>	Iso-Inflx=0,035    MZ-Iso=0,003    MZ+TS-MZ=0,005
<b>CD1+CD27-IgD-</b>	Iso-Inflx=0,040    MZ-Iso=0,003    MZ+TS-MZ=0,004
<b>CD19+CD27+IgD+</b>	MZ+TS-MZ=0,033
<b>CD19+CD27+IgD-</b>	Iso-Inflx=0,012    MZ+TS-Inflx=0,026    MZ+TS-MZ=0,021

Tabelle 18: Mittelwerte, Standardabweichung und Anzahl der Zytokine aus den Mäusversuchen der Spender A und B

Zytokine	Methylzellulose (MZ)			Testkomponente (MZ+TS)			Isotyp Antikörper (Iso.)			Infliximab (Inflx.)		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
<b>TGFβ</b>	18,17	1,03	6	16,67	0,52	6	18,17	0,41	6	18,3	1,99	5
<b>MCP3</b>	774,83	379,72	6	1001,1	1796,5	6	377,33	320,12	6	226,5	176,58	5
<b>CRP</b>	3928,2	634,55	6	2802,8	1947,9	6	3320,3	1387,1	6	3330,2	634,08	5
<b>IL6</b>	30,33	4,68	6	44,92	49	6	46,08	44,42	6	24,8	3,21	5
<b>IL12</b>	11	0,89	6	10,25	0,42	6	10,75	0,76	6	11	1,87	5
<b>IL17A</b>	9,92	0,8	6	9	0,63	6	8,83	0,41	6	9,1	1,14	5
<b>IFNγ</b>	18,33	6,25	6	15,67	1,03	6	16	0,89	6	16,5	1,22	5

Tabelle 19: Statistische Auswertung der Zytokine TGFβ und CRP

TGFβ	Differenz	95% Konfidenz Intervall			MCP3	Differenz	95% Konfidenz Intervall		
		unteres	oberes	p-Wert			unteres	oberes	p-Wert
<b>Iso.-Inflx.</b>	-1,33	-2,02	1,75	0,997	<b>Iso.-Inflx.</b>	150,83	-1483,03	1784,69	0,994
<b>MZ-Inflx.</b>	-1,33	-2,02	1,75	0,997	<b>MZ-Inflx.</b>	548,33	-1085,53	2182,19	0,782
<b>MZ+TS-Inflx.</b>	-1,63	-3,52	0,25	0,104	<b>MZ+TS-Inflx.</b>	774,58	-859,28	2408,44	0,554
<b>MZ-Iso.</b>	1,07	-1,8	1,8	1,000	<b>MZ-Iso.</b>	397,5	-1160,32	1955,32	0,889
<b>MZ+TS-Iso.</b>	-1,5	-3,3	0,3	0,123	<b>MZ+TS-Iso.</b>	623,75	-934,07	2181,57	0,679
<b>MZ+TS--MZ</b>	-1,5	-3,3	0,3	0,123	<b>MZ+TS--MZ</b>	226,25	-1331,57	1784,07	0,976
CRP	Differenz	95% Konfidenz Intervall			IL6	Differenz	95% Konfidenz Intervall		
		unteres	oberes	p-Wert			unteres	oberes	p-Wert
<b>Iso.-Inflx.</b>	-9,87	-2226,88	2207,14	1,000	<b>Iso.-Inflx.</b>	21,28	-36,68	79,25	0,733
<b>MZ-Inflx.</b>	597,97	-1619,04	2814,98	0,872	<b>MZ-Inflx.</b>	5,53	-52,43	63,5	0,993
<b>MZ+TS-Inflx.</b>	-527,37	-2744,38	1689,64	0,908	<b>MZ+TS-Inflx.</b>	20,12	-37,85	78,08	0,765
<b>MZ-Iso.</b>	607,83	-1506	2721,67	0,850	<b>MZ-Iso.</b>	-15,75	-71,02	39,52	0,853
<b>MZ+TS-Iso.</b>	-517,5	-2631,34	1596,34	0,900	<b>MZ+TS-Iso.</b>	-1,167	-56,43	54,1	1,000
<b>MZ+TS--MZ</b>	-1125,33	-3239,17	988,5	0,459	<b>MZ+TS--MZ</b>	14,58	-40,68	69,85	0,879

Tabelle 20: Statistische Auswertung der Zytokine IL-12 und IFN $\gamma$ 

<i>IL12</i>	<i>Differenz</i>	<i>95% Konfidenz Intervall</i>			<i>IL17A</i>	<i>Differenz</i>	<i>95% Konfidenz Intervall</i>		
		<i>unteres</i>	<i>oberes</i>	<i>p- Wert</i>			<i>unteres</i>	<i>oberes</i>	<i>p- Wert</i>
<i>Iso.-Inflx.</i>	-0,25	-2,07	1,57	0,980	<i>Iso.-Inflx.</i>	-0,27	-1,58	1,04	0,939
<i>MZ-Inflx.</i>	0	-1,82	1,82	1,000	<i>MZ-Inflx.</i>	0,82	-0,49	2,13	0,325
<i>MZ+TS-Inflx.</i>	-0,75	-2,57	1,07	0,660	<i>MZ+TS-Inflx.</i>	-0,1	-1,41	1,21	0,996
<i>MZ-Iso.</i>	0,25	-1,49	1,99	0,977	<i>MZ-Iso.</i>	1,08	-0,17	2,33	0,103
<i>MZ+TS-Iso.</i>	-0,5	-2,24	1,24	0,849	<i>MZ+TS-Iso.</i>	0,17	-1,08	1,42	0,981
<i>MZ+TS--MZ</i>	-0,75	-2,49	0,99	0,626	<i>MZ+TS--MZ</i>	-0,92	-2,17	0,33	0,201
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	<i>Differenz</i>	<i>95% Konfidenz Intervall</i>							
		<i>unteres</i>	<i>oberes</i>	<i>p- Wert</i>					
<i>Iso.-Inflx.</i>	-0,5	-6,17	5,17	0,994					
<i>MZ-Inflx.</i>	1,83	-3,84	7,5	0,800					
<i>MZ+TS-Inflx.</i>	-0,83	-6,5	4,84	0,976					
<i>MZ-Iso.</i>	2,33	-3,07	7,74	0,626					
<i>MZ+TS-Iso.</i>	-0,33	-5,74	5,07	0,998					
<i>MZ+TS--MZ</i>	-2,67	-8,07	2,74	0,522					

Tabelle 21: Auswertung der Korrelation nach Pearson

	<i>Histologischer Score</i>			<i>Klinischer Score</i>			<i>Makroskopischer Kolon Score</i>		
	<i>Korrelation</i>	<i>N</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Korrelation</i>	<i>N</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Korrelation</i>	<i>N</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Histologischer Score</i>	1,00	46	0,00	0,71	46	0,00	0,40	46	0,08
<i>Klinischer Score</i>	0,71	46	0,00	1,00	46	0,00	0,43	46	0,04
<i>Makroskopischer Kolon Score</i>	0,40	46	0,01	0,43	46	0,00	1,00	46	0,00
<i>M1 Monozyten</i>	0,51	22	0,01	0,06	22	0,80	0,34	22	0,12
<i>M2 Monozyten</i>	0,24	22	0,27	-0,15	22	0,50	0,47	22	0,03
<i>CD4+CD134+</i>	0,34	22	0,13	-0,02	22	0,93	0,02	22	0,93
	<i>M2 Monozyten</i>			<i>CD4+CD134+</i>			<i>M1 Monozyten</i>		
	<i>Korrelation</i>	<i>N</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Korrelation</i>	<i>N</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Korrelation</i>	<i>N</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Histologischer Score</i>	0,24	22	1,00	0,34	22	0,85	0,51	22	0,16
<i>Klinischer Score</i>	-0,15	22	1,00	-0,02	22	1,00	0,06	22	1,00
<i>Makroskopischer Kolon Score</i>	0,47	22	0,29	0,02	22	1,00	0,34	22	0,85
<i>M1 Monozyten</i>	0,52	22	0,16	0,39	22	0,56	1,00	22	0,00
<i>M2 Monozyten</i>	1,00	22	0,00	0,42	22	0,45	0,52	22	0,01
<i>CD4+CD134+</i>	0,42	22	0,05	1,00	22	0,00	0,39	22	0,07

Tabelle 22: Liste der verwendeten FACS Antikörper. T=T-Zelle, B=B-Zelle, Mo=Monozyt, NK/NKT=Natürliche Killerzellen, DC=Dendritische Zellen, Mak=Makrophagen. Es handelt sich, falls nicht angegeben um humane Antikörper. Firma Biolegend=Biolegend (San Diego, CA, USA)

Marker	Funktion	Expression	Farbe	Klon	Katalog Nr.	Firma
CD45	T- und B-Zellaktivierung durch Antigen Rezeptor	Leukozyten	APC Cy7	2D1	368515	Biolegend
mCD45	T- und B-Zellaktivierung durch Antigen Rezeptor	Leukozyten	PE Cy7	30-F11	103113	Biolegend
CD4	Ko-rezeptor für MHCII Moleküle	T, Mo, Mak	APC Cy7	OKT4	317417	Biolegend
CD25	A-Kette des IL-2 Rezeptors	Aktivierte T+B, Mo	PE Cy7	BC96	302611	Biolegend
CD134	Rezeptor für OX40, T-Zellaktivierung	Aktivierte T	PE	ACT35	350003	Biolegend
CD14	Rezeptor für den Komplex aus LPS und LPB	Mo, Mak	APC Cy7	HCD14	325619	Biolegend
CD1a	MHCI Moleküle, Präsentation Lipidantigene	Thymozyten, DC, B	Biotin/FITC	HI149	300112	Biolegend
CD252	T-Zellaktivierung	Aktivierte B, DC	PE	11C3.1	326307	Biolegend
TSLPR	Zellproliferation	T+B, NKT	APC	IB4	322807	Biolegend
CD163	Endozytose	Mo, Mak	FITC	GHI/61	333617	Biolegend
CD64	Phagozytose	Mo, Mak	PerCP Cy5.5	10.1	305023	Biolegend
CD206	Endo- und Phagozytose	Mak, Endothelzelle	APC	15.2	321109	Biolegend
CD69	Typ II C-Lektin Rezeptor, B -und T-Zellaktivierung	Aktivierte T+B, Mak	FITC	FN50	310903	Biolegend
CD103	$\alpha$ E Integrin	Intraepitheliale Lymphozyten	APC	Ber-ACT8	350215	Biolegend
CD127	IL-7 Rezeptor	Gereifte T, ILC, Mo	PerCP Cy5.5	A019D5	351321	Biolegend
CD19	Komplexbildung mit CD21+CD81, Korezeptor B-Zelle	B	PerCP Cy5.5	HIB19	302230	Biolegend
IgD	Immunglobulin D	B	APC Cy7	IA6-2	348217	Biolegend
CD27	Bindet CD70, Kostimulator für T-und B-Zelle	Thymocytes, T, NK, B	PE Cy7	M-T271	356411	Biolegend
CD45RO	Isoform von CD45, noch keine A, B und C exons	T+B, Mo, Mak	PE	UCHL1	304205	Biolegend
CD45RA	Isoform von CD45 mit A exon	B+T, Mo	PE Cy7	HI100	304125	Biolegend
CD62L	Adhäsions Molekül, bindet Mo ans Endothel	B+T, Mo, NK	FITC	BC96	302611	Biolegend
CD197 (CCR7)	Migration von B+T in lymphatisches Gewebe	Aktivierte T+B	PE Cy7	G043H7	353213	Biolegend
CD38	B-Zellproliferation	Frühe B+T, aktivierte T	PE	HB-7	356603	Biolegend
Streptavidin	Nachweis biotinylierter Biomoleküle (z.B. Antikörper)		FITC		405201	Biolegend





**R-Skripte**

Datensatz (dt) einlesen für alle nachfolgenden R-Befehle:

```
dt<- data.frame(read.xlsx("Histologischer.Score.xlsx", sheet=1))
```

Histogramm zum Test auf Normalverteilung:

```
subset(dt, dt$Behandlung == "Methylzellulose")  
hist(Methylzellulose$Histologischer.Score, main="Histologischer Score", ylab =  
"Häufigkeit", xlab = "Methylzellulose", col="light blue")
```

Shapiro Test auf Normalverteilung:

```
tapply(dt$Histologischer.Score, INDEX = dt$Behandlung, FUN = shapiro.test)
```

Levene Test:

```
leveneTest(dt$Histologischer.Score, dt$Behandlung)
```

Einfaktorielle ANOVA mit paarweisem T-Test und  $\alpha$ -Fehler-Korrektur nach Bonferroni:

```
aov(formula = dt$Histologischer.Score ~ dt$Behandlung, data = dt)  
pairwise.t.test(x = dt$Histologischer.Score, g = dt$Behandlung, p.adjust.method  
= "bonferroni")
```

post-hoc Test: TukeyHSD:

```
TukeyHSD(aov(formula = dt$Histologischer.Score ~ dt$Behandlung, data = dt))
```

Kruskal-Wallis Test mit paarweisem Wilcoxon-Test und  $\alpha$ -Fehler-Korrektur nach Bonferroni:

```
kruskal.test(dt$Klinischer.Score ~ dt$Behandlung)  
pairwise.wilcox.test(dt$Klinischer.Score, dt$Behandlung, paired = FALSE,  
p.adjust = "bonferroni")
```

Post-hoc Test: Dunn-Bonferroni-Test mit adjustierten P-Werten nach Bonferroni:

```
dunnTest(dt$Klinischer.Score, dt$Behandlung, method = "bonferroni")
```

Deskriptive Statistik:

```
describe(Methylzellulose$Histologischer.Score)
```

Säulendiagramm:

```
brewer.pal( n = 3, name = "Set1 ")
p <- ggplot(data=dt, aes(x = Marker, y = Wert, fill=factor(Behandlung, levels =
c("Gesund", "A", "B"))))
p + geom_bar(stat = "identity", position = "dodge", width = 0.5)+
labs(y="Subtypes of CD14+ monocytes [%]", x=element_blank())+
scale_color_brewer(palette("Set1"), name="Behandlung")+
theme(axis.test.x = elem_text(angle = 45, hjust = 1))
```

Cumming Plot:

```
Scores <- tibble(dt)
shared.control <- dabest(Scores, Behandlung, Kolon_Score, idx = list(c("MZ",
"MZ_TS"), c("Isotyp", "Infliximab")))
Scores.mean_diff <- mean_diff(shared.control, ci=95)
plot(Scores.mean_diff, slopegraph=TRUE, group.summaries="mean_sd",
rawplot.type = c("swarmplot", "sinaplot"), rawplot.markersize = 2,
rawplot.ylabel = "Kolon Score", palette = "Dark2", effsize.markersize = 4,
theme = ggplot2::theme_classic(), tick.fontsize = 20, axes.title.fontsize = 20,
swarmplot.params = NULL)
```

Principal Component Analysis:

```
myPr <- prcomp(dt[,2:4], scale = TRUE)
str(myPr)
dt2 <- cbind(dt, myPr$x[,1:3])
head (dt2)
df.pca <- prcomp(dt[2:4], center=TRUE, scale=TRUE)
fviz_pca_ind(df.pca, geom.ind = „point“, pointshape = 21, pointsize = 2, fill.ind.
= dt$Behandlung, col.ind = "black", palette = "Dark2", addEllipses = TRUE,
label = "var", col.var = "black", repel = TRUE, legend.title = "Behandlung")
PCAloadings <- myPr$rotation
```

Korrelationsmatrix nach Pearson:

```
daten_x <- dt[2:7]
corr.test(daten_x, method = „pearson“)
corPlot(daten_x, numbers=FALSE, main="Korrelationsplot nach Pearson")
```

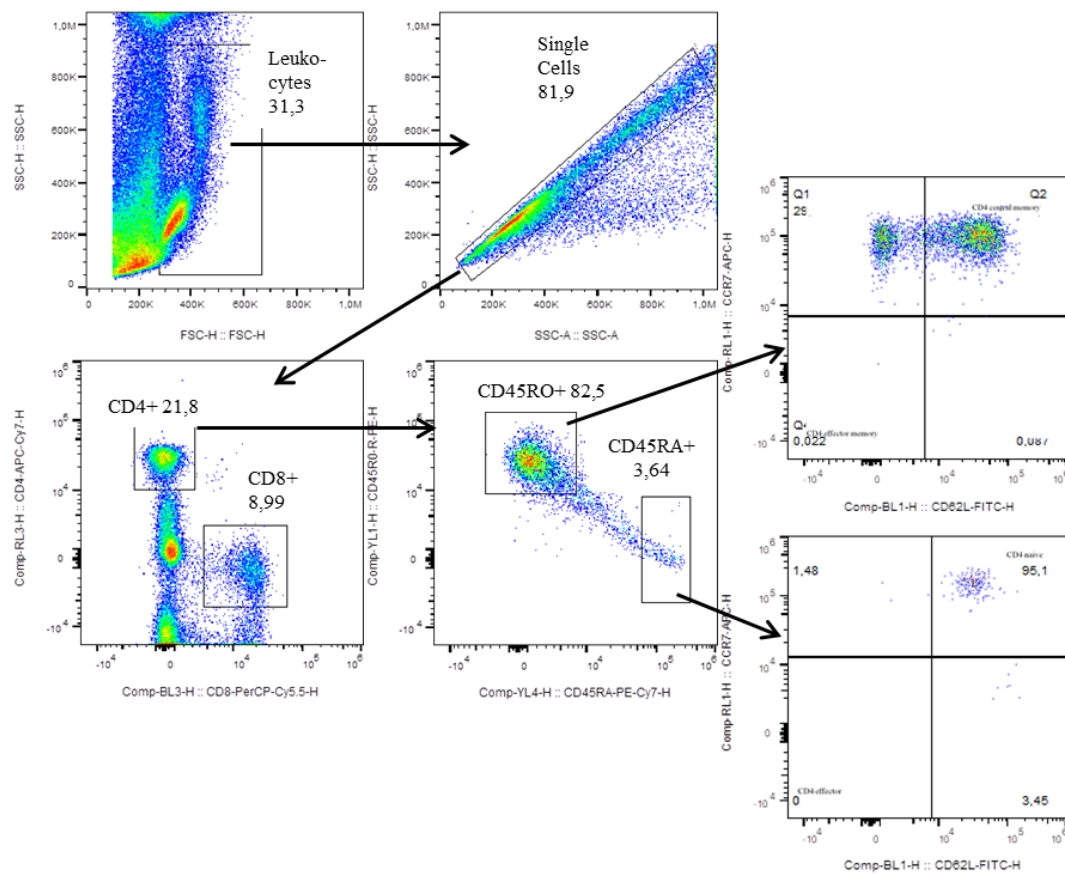
**PBMC Gatingstrategien**

Abbildung 22: PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der T-Zellen, Teil 1

Gemessen wurden die Zellpopulationen: CD4+CD45RO+ und CD4+CD45RA+.

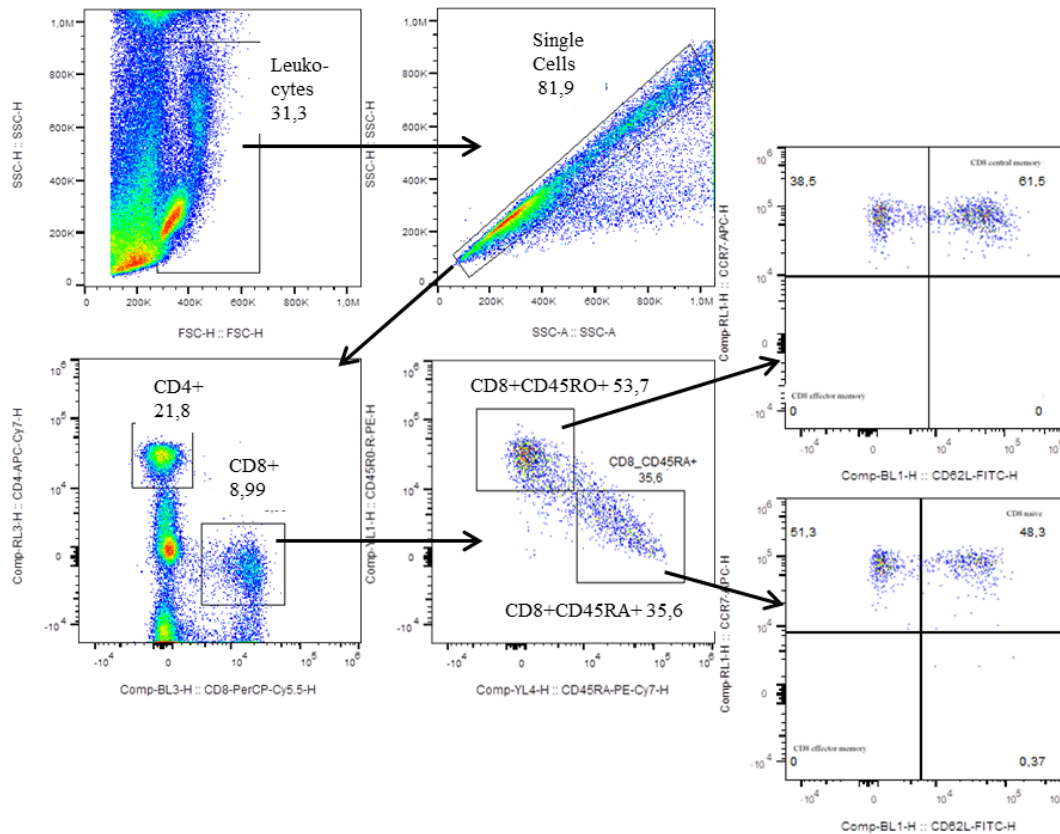


Abbildung 23: PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der T-Zellen, Teil 2

Gemessen wurden die Populationen: CD8+CD45RO+ und CD8+CD45RA+.

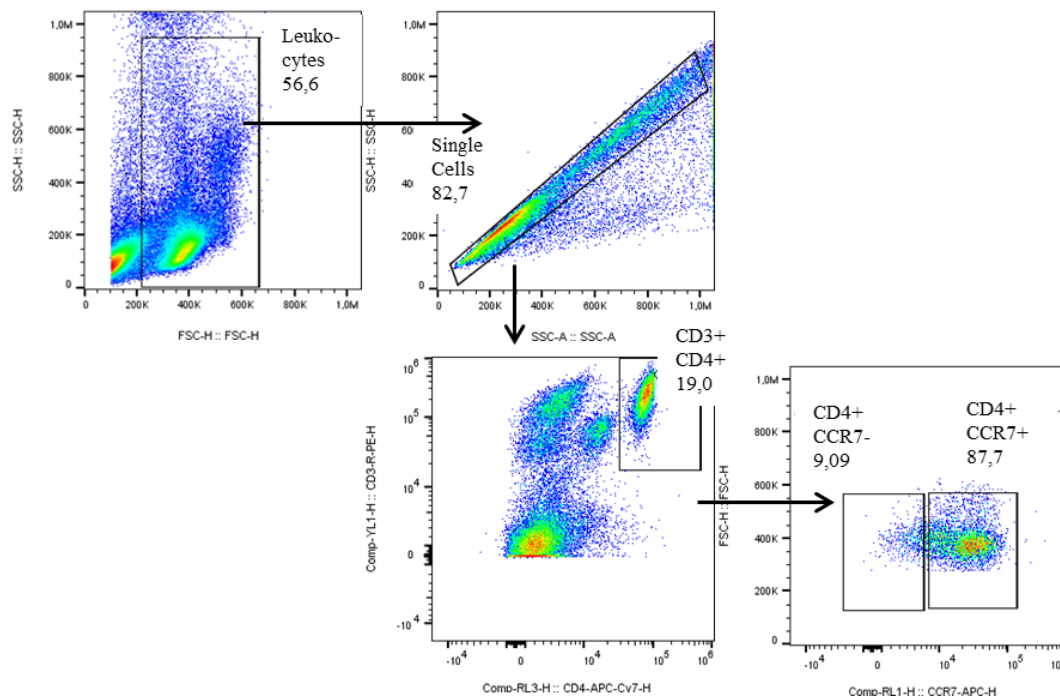


Abbildung 24: PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der T-Zellen, Teil 3

Identifiziert wurden die Zellpopulationen: CD3+CD4+CCR7- und CD3+CD4+CCR7+.

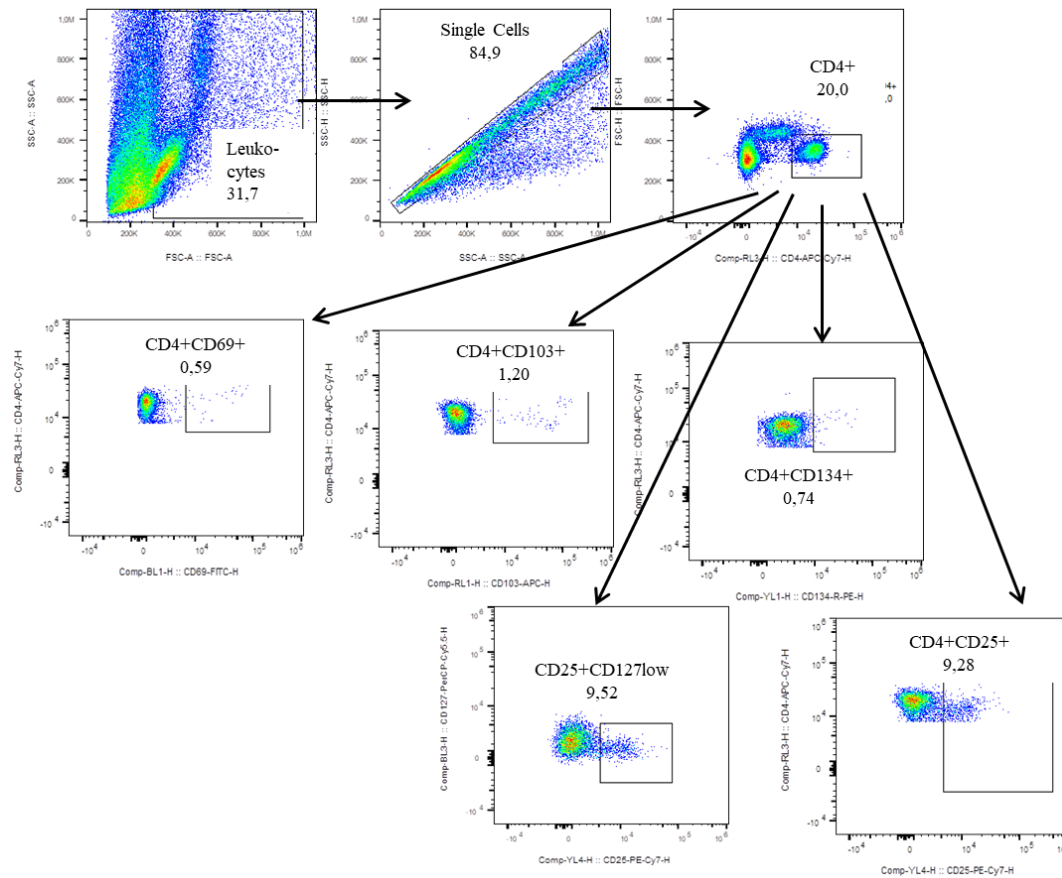


Abbildung 25: PBMC Gatingstrategie zur Auswertung aktivierter T-Zellen

Bestimmt wurden die Zellpopulationen: CD4+CD69+, CD4+CD103+, CD4+CD134+, CD4+CD25+ und CD4+CD25-CD127low.

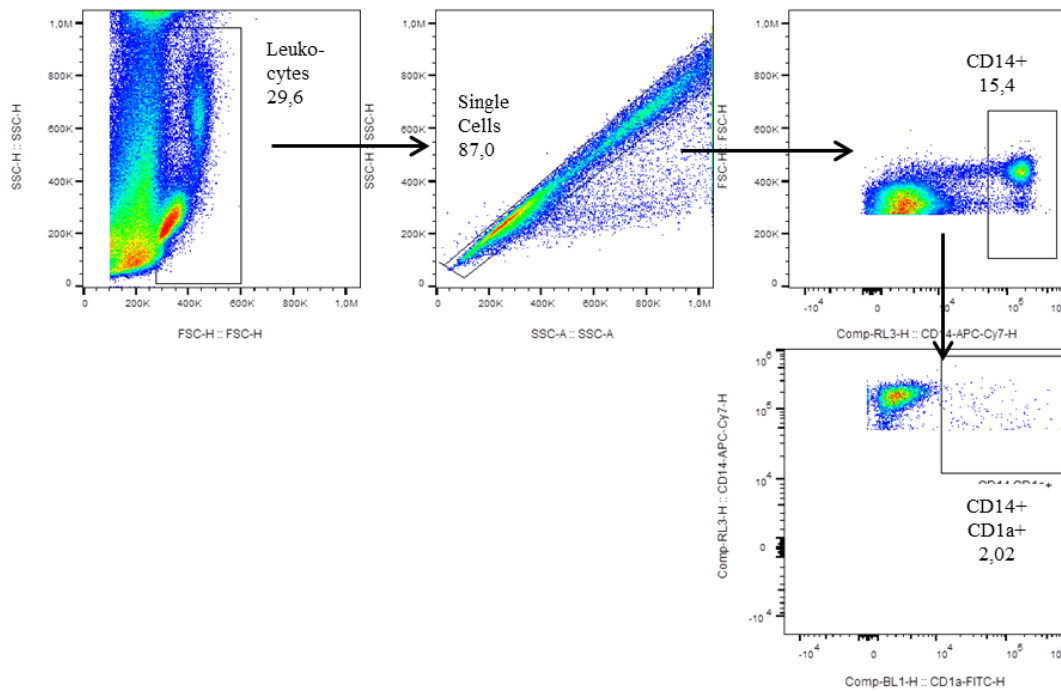


Abbildung 26: PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der Monozytenpopulation CD14+CD1a+

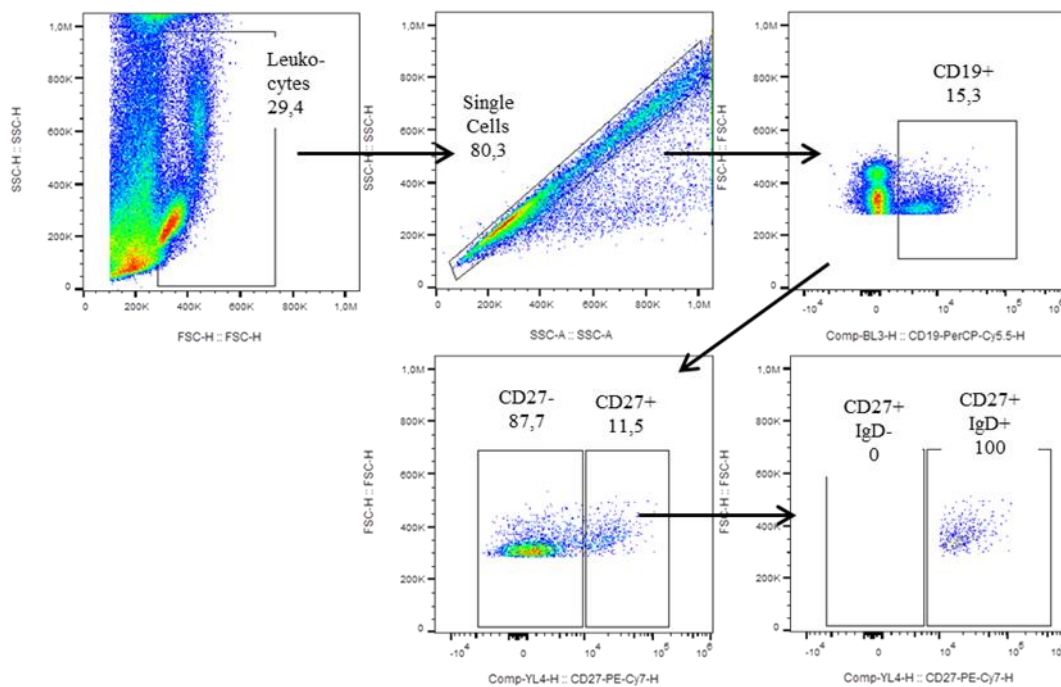


Abbildung 27: PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der B-Zellen

Identifiziert wurden die Zellpopulationen: CD19+CD27+IgD-, CD19+CD27+IgD+, CD19+CD27-IgD- und CD19+CD27-IgD+.

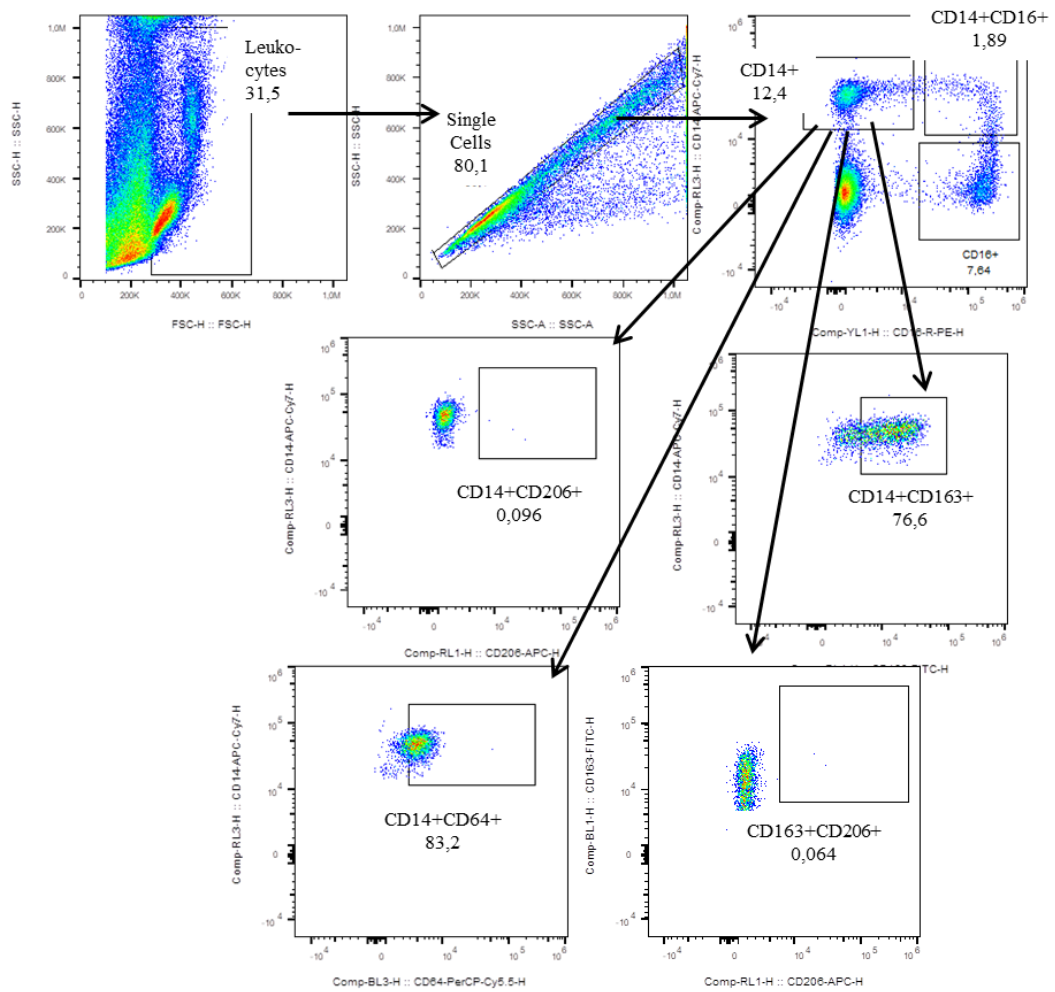


Abbildung 28: PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der Monozyten

Bestimmt wurden die Populationen: CD14+CD64+, CD14+CD163+CD206+, CD14+CD206+ und CD14+CD163+.

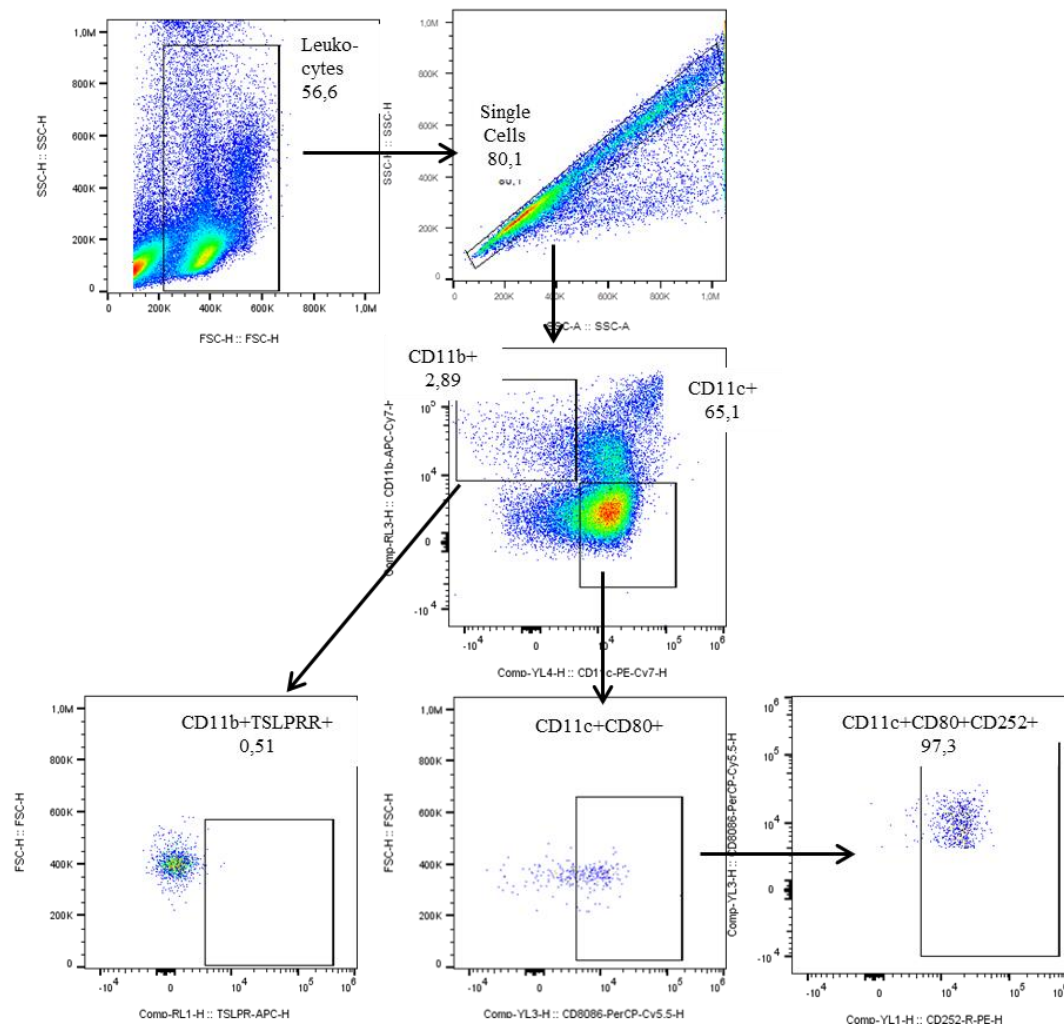


Abbildung 29: PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der dendritischen Zellen

Gemessen wurden die Populationen: CD11bTSLPR+ und CD11c+CD80+CD252+



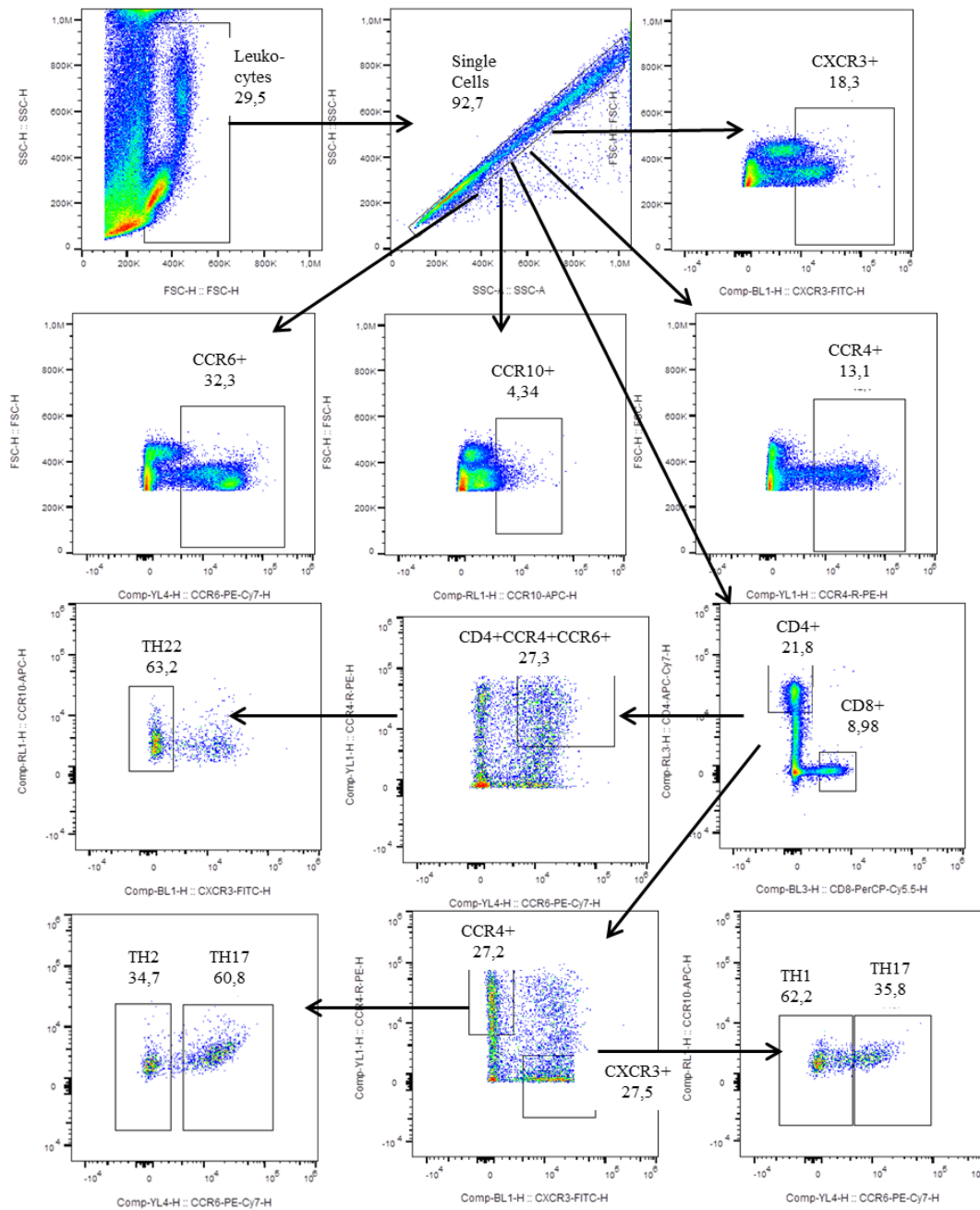


Abbildung 30: PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der T-Helfer Zellen

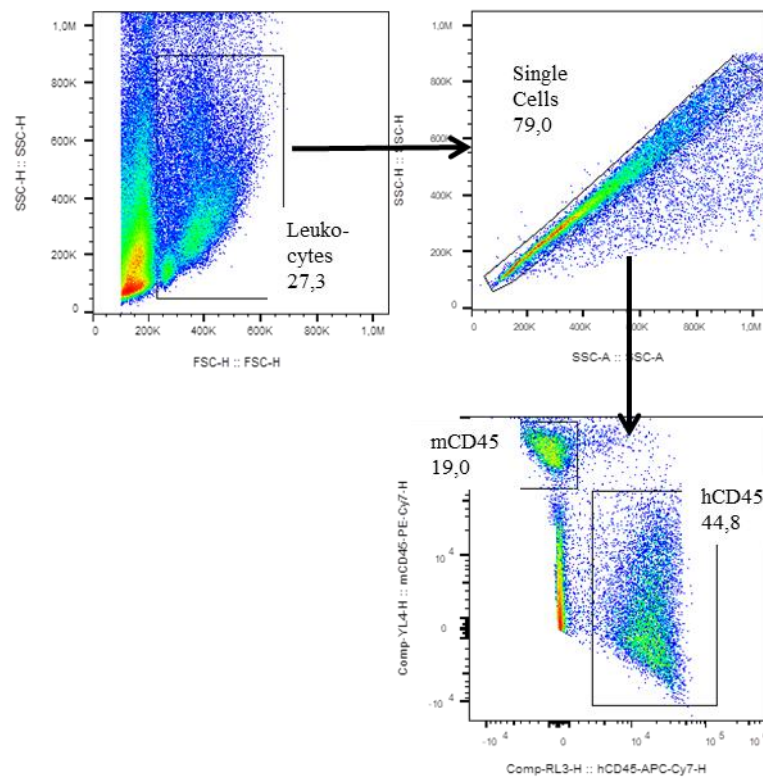
**Milz Gatingstrategien**

Abbildung 31: Milz Gatingstrategie zur Auswertung der humanenCD45+ und murinenCD45+

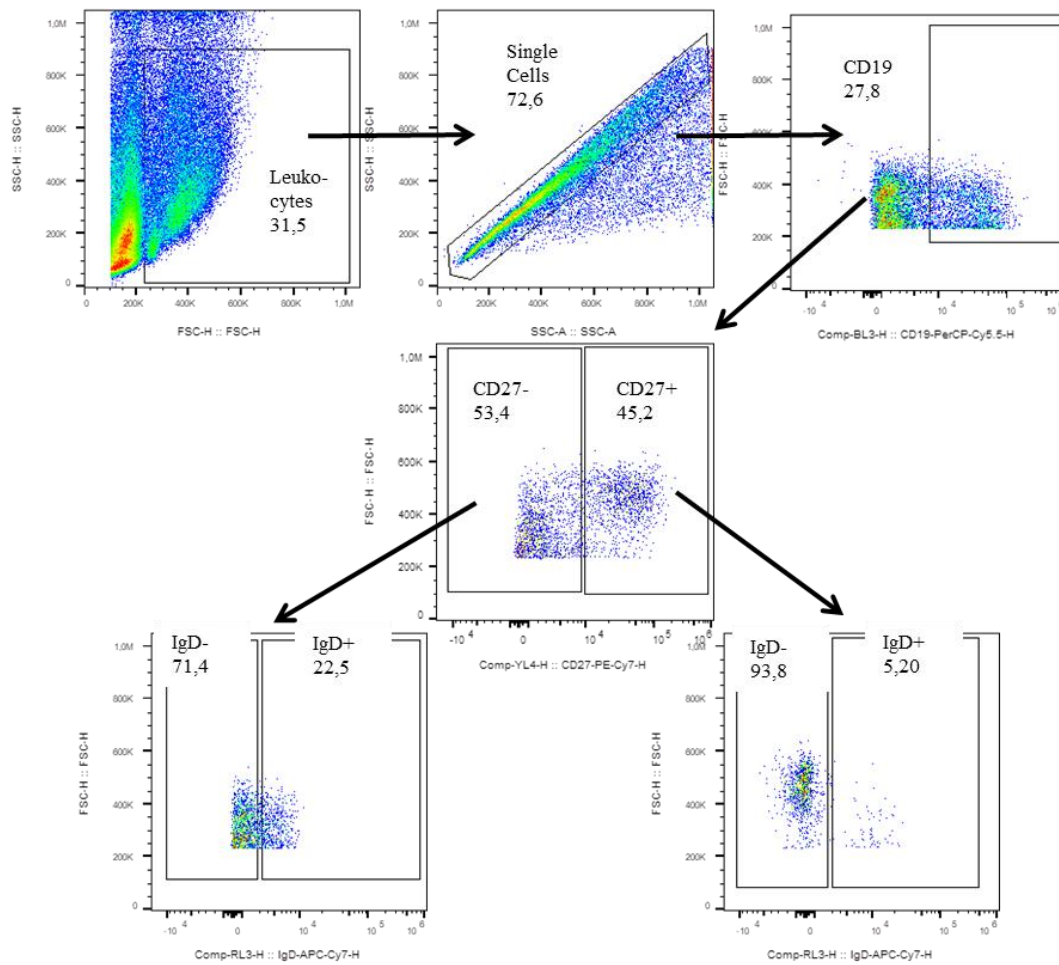


Abbildung 32: Milz Gatingstrategie zur Auswertung der B-Zellen

Bestimmt wurden die Zellpopulationen: CD19+CD27-IgD-, CD19+CD27-IgD+, CD19+CD27+IgD- und CD19+CD27+IgD+.

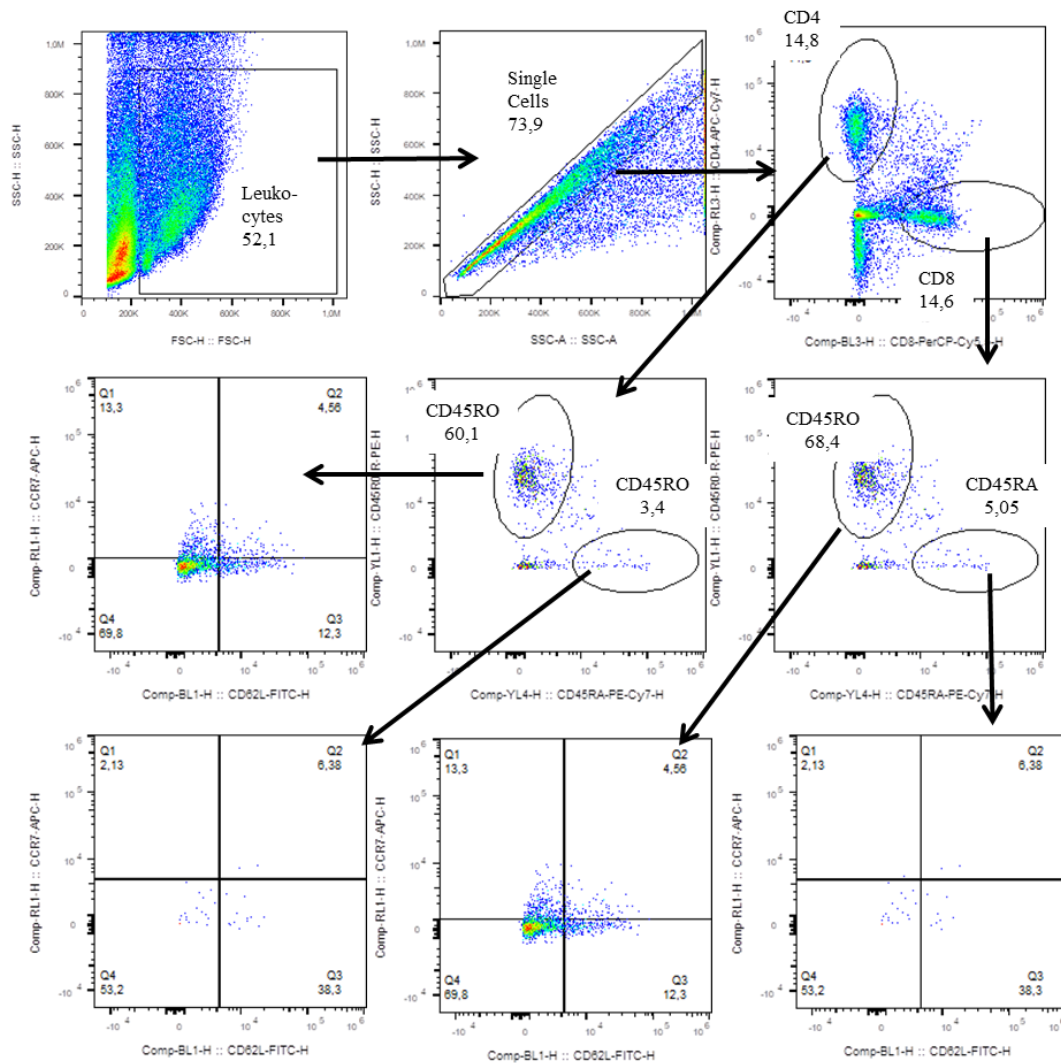


Abbildung 33: Milz Gatingstrategie der T-Zellen

Identifiziert wurden die Zellpopulationen: CD4+CD45+RO+, CD4+CD45+RA+, CD8+CD45+RO+ und CD8+CD45+RA+.

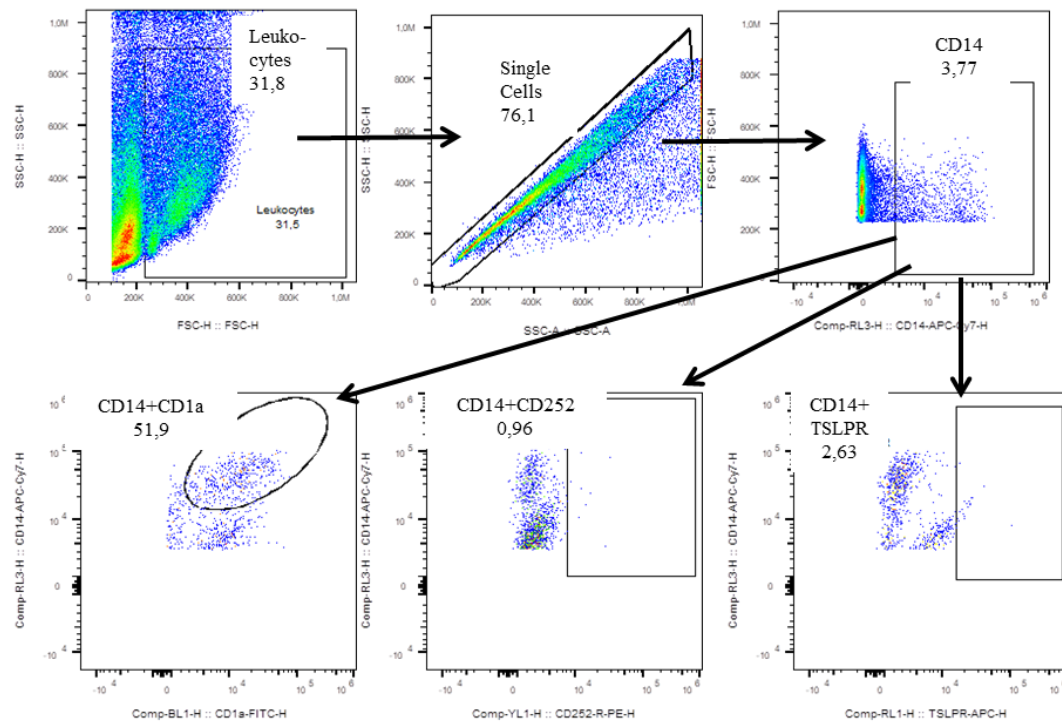


Abbildung 34: Milz Gatingstrategie zur Auswertung der Monozyten, Teil 1

Bestimmt wurden die Monozytenpopulationen: CD14+CD1a+, CD14+CD252+ und CD14+TSLPR+.

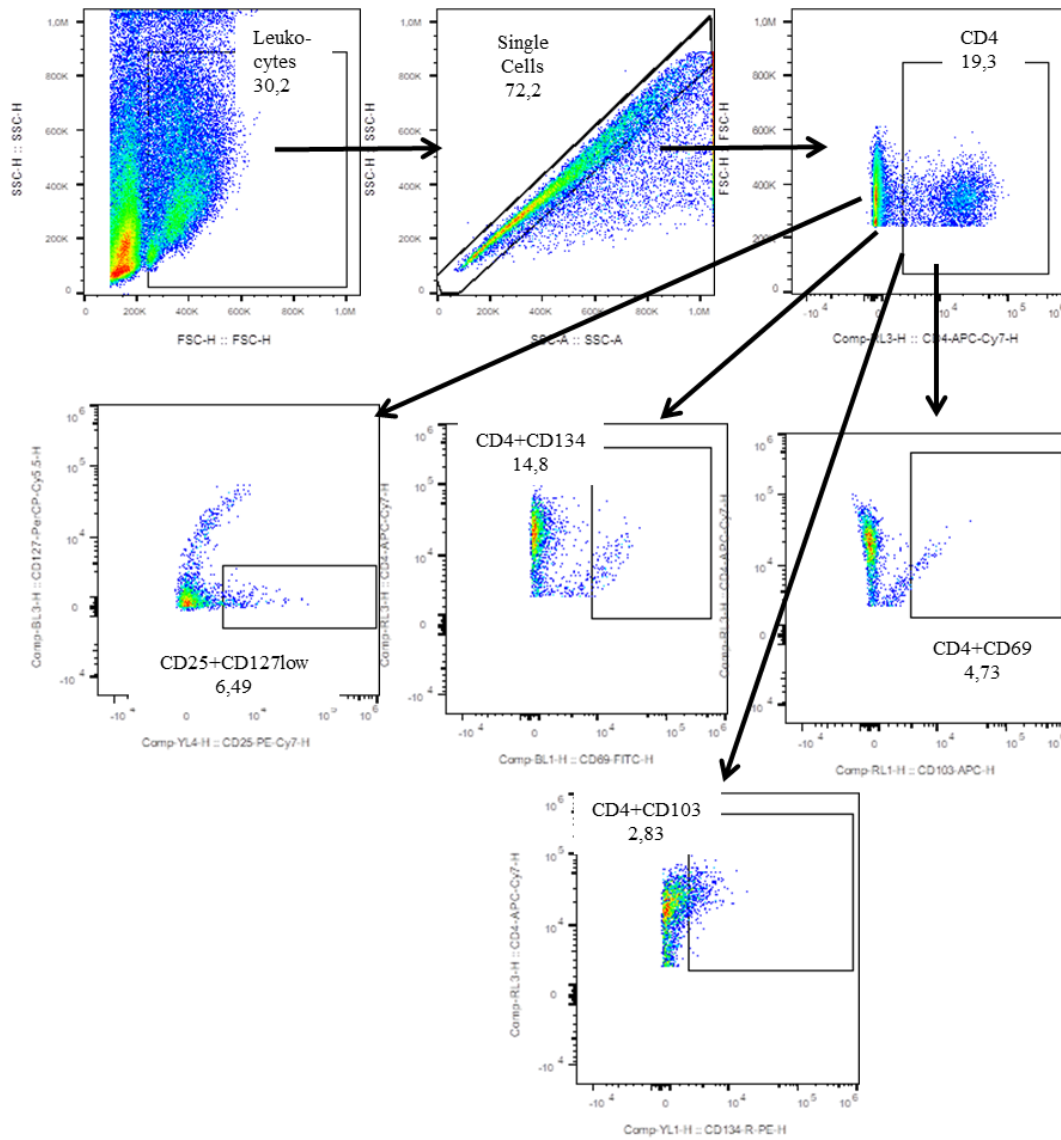


Abbildung 35: Milz Gatingstrategie zur Auswertung der T-Zellaktivierung

Gemessen wurden die T-Zellpopulationen: CD4+CD134+, CD4+CD69+, CD4+CD103+ und CD4+CD25+CD127low.

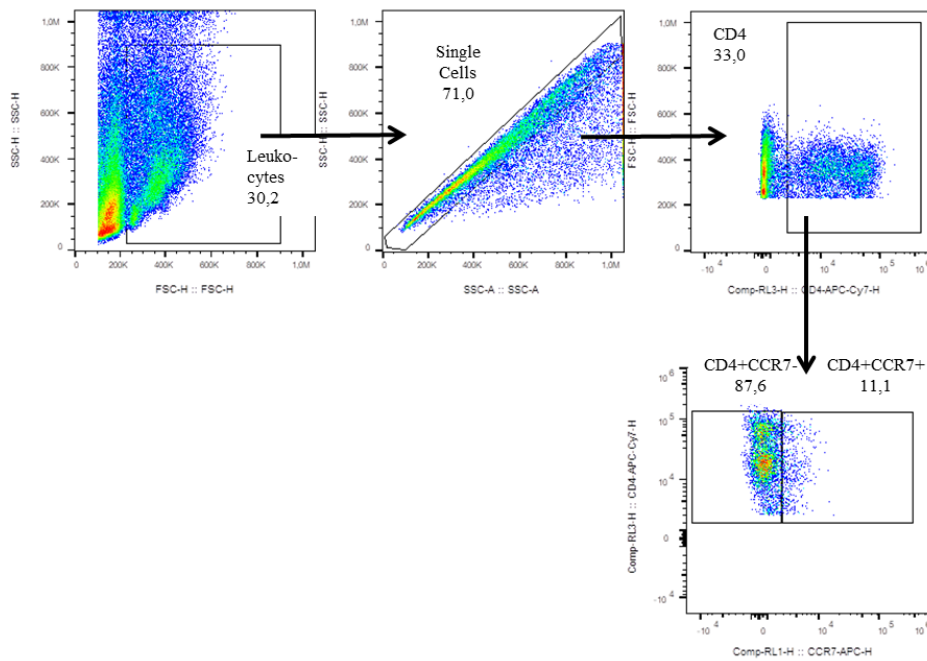


Abbildung 36: Milz Gatingstrategie zur Auswertung der T-Zellen CD4+CCR7+ und CD4+CCR7-

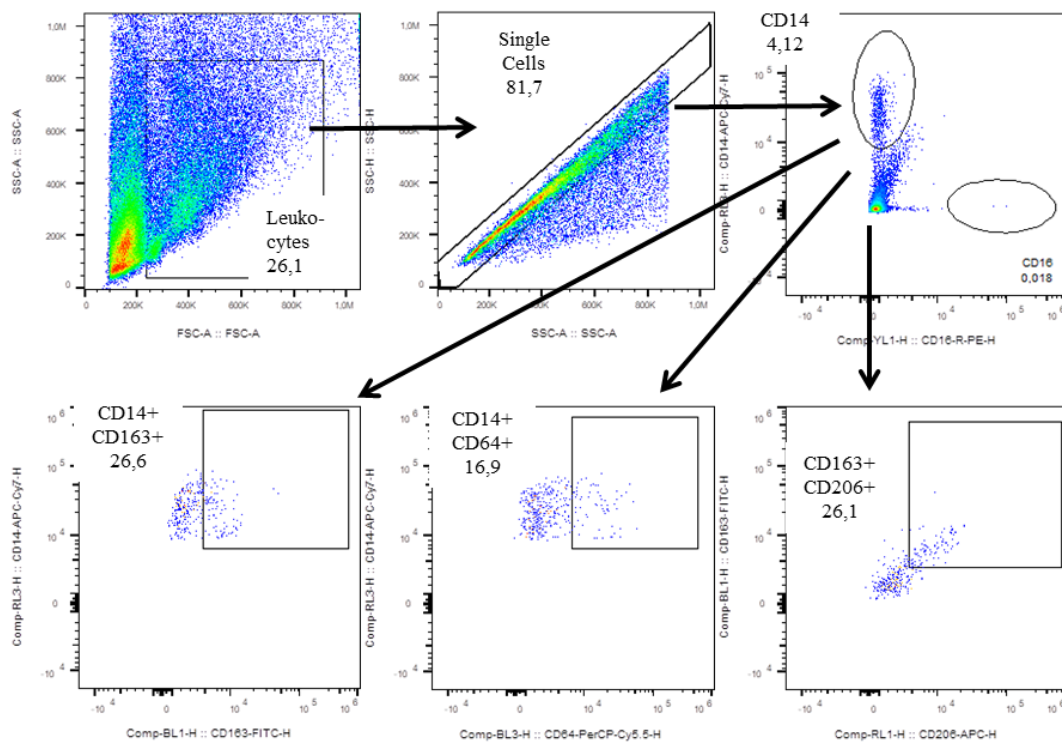


Abbildung 37: Milz Gatingstrategie zur Auswertung der Monozyten

Identifiziert wurden CD14+CD163+, CD14+CD64+ und CD14+CD163+CD206+.

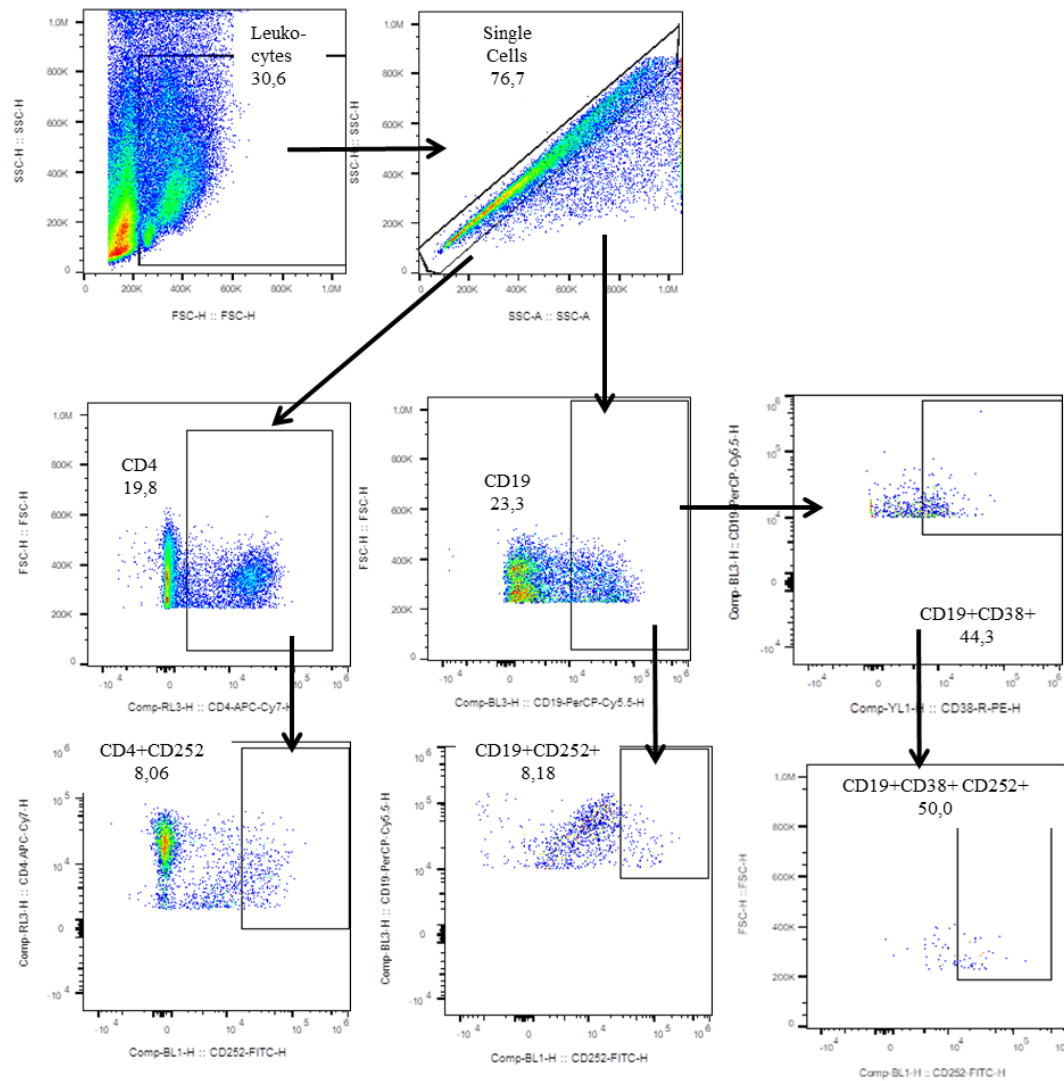


Abbildung 38: Milz Gatingstrategie der T- und B-Zellen

Identifiziert wurden die Zellpopulationen: CD19+CD252+, CD4+CD252+, CD19+CD38+ und CD19+CD38+CD252+.



**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	<i>Colitis ulcerosa als multifaktorielles Krankheitsbild.....</i>	15
Abbildung 2:	<i>Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Colitis ulcerosa spielt ein Zusammenbruch der Barrierefunktion der intestinalen Membran (Ungaro et al., 2017).....</i>	17
Abbildung 3	<i>Auswanderung der Monozyten in inflammatorisches Gewebe und Differenzierung zu M1 und M2 Makrophagen.....</i>	27
Abbildung 4:	<i>Beispielaufnahmen zu den Befunden des histologischen Scores aus Tabelle 8 .....</i>	50
Abbildung 5:	<i>Beispielaufnahmen einer IHC-Färbung.....</i>	53
Abbildung 6:	<i>PBMC Auswertung der Spender .....</i>	56
Abbildung 7:	<i>A: Repräsentative Foto des Kolons zur Beurteilung des makroskopischen Kolon Scores. B: Klinischer Score und Kolon Score als Cumming Plots .....</i>	59
Abbildung 8:	<i>Repräsentative Bilder der histologischen Schnitte .....</i>	61
Abbildung 9:	<i>Histologischer Score als Cumming Plot .....</i>	62
Abbildung 10:	<i>Oben: Frequenz humaner Leukozytenpopulationen als Cumming Plot. Unten: Subtypen der CD14+ Zellen als Cumming Plot.....</i>	64
Abbildung 11:	<i>Frequenz aktivierter T- Zellen als Cumming Plot .....</i>	66
Abbildung 12:	<i>Frequenz der Subtypen der B-Zellen (CD19+) als Cumming Plot .....</i>	68
Abbildung 13:	<i>PCA der klinischen Scores.....</i>	70
Abbildung 14:	<i>PCA der Zellpopulationen CD4+CD134+, CD14+CD64+ (M1 Monozyten), CD14+CD163+CD206 (M2 Monozyten) .....</i>	71
Abbildung 15:	<i>Korrelationsmatrix nach Pearson.....</i>	72
Abbildung 16:	<i>Zytokin Sekretion der aktivierten T-Zellen als Cumming Plot. Zytokinlevel von IL-17A, CRP, TGFβ.....</i>	74
Abbildung 17:	<i>IHC Färbung der Biopsie. A.1-A.3 Nicht inflammatorische Biopsie. B.1-B.3 Inflammatorische Biopsie .....</i>	76
Abbildung 18:	<i>IHC-Färbung des distalen Parts des Kolons, Vergleich zwischen der Methylzellulose Gruppe und 10 mg/kg Testkomponente .....</i>	78
Abbildung 19:	<i>IHC Färbung des distalen Parts des Kolons, Vergleich der Methylzellulose und 10mg/kg Testsubstanz .....</i>	79
Abbildung 20:	<i>IHC Färbung des distalen Parts des Kolons, Gruppe: 6 mg/kg Isotyp Antikörper.....</i>	80

Abbildung 21:	<i>IHC Färbung des distalen Parts des Kolons. Gruppe: 6mg/kg Infliximab .....</i>	<i>81</i>
Abbildung 22:	<i>PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der T-Zellen, Teil 1 .</i>	<i>131</i>
Abbildung 23:	<i>PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der T-Zellen, Teil 2 .</i>	<i>132</i>
Abbildung 24:	<i>PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der T-Zellen, Teil 3 .</i>	<i>132</i>
Abbildung 25:	<i>PBMC Gatingstrategie zur Auswertung aktivierter T-Zellen .</i>	<i>133</i>
Abbildung 26:	<i>PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der Monozytenpopulation CD14+CD1a+ .....</i>	<i>134</i>
Abbildung 27:	<i>PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der B-Zellen .....</i>	<i>134</i>
Abbildung 28:	<i>PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der Monozyten.....</i>	<i>135</i>
Abbildung 29:	<i>PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der dendritischen Zellen .....</i>	<i>136</i>
Abbildung 30:	<i>PBMC Gatingstrategie zur Auswertung der T-Helfer Zellen .</i>	<i>137</i>
Abbildung 31:	<i>Milz Gatingstrategie zur Auswertung der humanenCD45+ und murinenCD45+ .....</i>	<i>138</i>
Abbildung 32:	<i>Milz Gatingstrategie zur Auswertung der B-Zellen .....</i>	<i>139</i>
Abbildung 33:	<i>Milz Gatingstrategie der T-Zellen.....</i>	<i>140</i>
Abbildung 34:	<i>Milz Gatingstrategie zur Auswertung der Monozyten, Teil 1 .</i>	<i>141</i>
Abbildung 35:	<i>Milz Gatingstrategie zur Auswertung der T-Zellaktivierung..</i>	<i>142</i>
Abbildung 36:	<i>Milz Gatingstrategie zur Auswertung der T-Zellen CD4+CCR7+ und CD4+CCR7- .....</i>	<i>143</i>
Abbildung 37:	<i>Milz Gatingstrategie zur Auswertung der Monozyten .....</i>	<i>143</i>
Abbildung 38:	<i>Milz Gatingstrategie der T- und B-Zellen.....</i>	<i>144</i>

**Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Klassifizierung der Colitis ulcerosa anhand des Ausbreitungsgrades.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 2: Montréal Klassifikation zur Beurteilung des Schweregrades der Colitis ulcerosa .....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 3: Einteilung der Versuchsgruppen.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 4: Behandlungsprotokoll .....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 5: Kriterien zur Bewertung der klinischen Aktivität .....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 6: Makroskopische Beurteilung des Kolons.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 7: Zellen gemessen in der Durchflusszytometrie.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 8: Kriterien des histologischen Scores .....</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 9: Luminex Beads mit Katalognummer und RRID.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 10: Immunologische und klinische Auswertung der Spender zur Identifizierung eines optimalen Profils für den Einsatz des Monozyteninhibitors</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 11: Statistiktabelle zu der Korrelationsmatrix nach Pearson .....</i>	<i>73</i>
<i>Tabelle 12: Statistische Auswertung der PBMCs aus den Gruppen Gesund, Spender A und Spender B.....</i>	<i>119</i>
<i>Tabelle 13: Mittelwerte, Standardabweichung und p-Werte der Scores .....</i>	<i>120</i>
<i>Tabelle 14: Statistische Auswertung des histologischen und makroskopischen Kolon Scores .....</i>	<i>120</i>
<i>Tabelle 15: Statistische Auswertung des klinischen Scores .....</i>	<i>121</i>
<i>Tabelle 16: Statistische Auswertung der Milz FACS Analyse aus den Versuchen mit Spender A und B.....</i>	<i>122</i>
<i>Tabelle 17: P-Werte der Milz FACS Auswertung .....</i>	<i>123</i>
<i>Tabelle 18: Mittelwerte, Standardabweichung und Anzahl der Zytokine aus den Mausversuchen der Spender A und B .....</i>	<i>124</i>
<i>Tabelle 19: Statistische Auswertung der Zytokine TGF<math>\beta</math> und CRP .....</i>	<i>124</i>
<i>Tabelle 20: Statistische Auswertung der Zytokine IL-12 und IFN<math>\gamma</math>.....</i>	<i>125</i>
<i>Tabelle 21: Auswertung der Korrelation nach Pearson .....</i>	<i>126</i>
<i>Tabelle 22: Liste der verwendeten FACS Antikörper. T=T-Zelle, B=B-Zelle, Mo=Monozyt, NK/NKT=Natürliche Killerzellen, DC=Dendritische Zellen, Mak=Makrophagen. Es handelt sich, falls nicht angegeben um humane Antikörper. Firma Biolegend=Biolegend (San Diego, CA, USA) .....</i>	<i>127</i>



## 11 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Betreuern Frau Dr. Roswitha Gropp, Herr Prof. Dr. Matthias Siebeck und Herr Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Unterstützung, die Motivation und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an meine Kollegen Marietta, Anna-Lena, Simge, Veronika und Paula für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung während meiner praktischen Arbeit. Vielen Dank an Marietta für die gemeinsamen Wochenenddienste und die schöne Zeit.

Ein großes Dankeschön geht an das gesamte Team der Zentralen Versuchstierhaltung für die großartige Arbeit und das Engagement bei der Durchführung meiner Versuche.

Ich möchte mich insbesondere bei Sophie für die rückhaltlose Unterstützung bedanken. Lieben Dank an Natalie und Tina, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung seit Beginn des Studiums. Lieben Dank an Tristan, der zu jeder Tages- und Nachtzeit seine Hilfe anbot.